



**Universidad
Politécnica
de Cartagena**

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRARIA

**Procesos biogeoquímicos y eliminación de
nitrógeno y fósforo de aguas eutrofizadas en
humedales del entorno del Mar Menor: resultados
experimentales en mesocosmos**

TESIS DOCTORAL

María del Carmen Tercero Gómez

2016



**Universidad
Politécnica
de Cartagena**

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRARIA

**Procesos biogeoquímicos y eliminación de
nitrógeno y fósforo de aguas eutrofizadas en
humedales del entorno del Mar Menor: resultados
experimentales en mesocosmos**

TESIS DOCTORAL

María del Carmen Tercero Gómez

DIRECTORES:

María Nazaret González Alcaraz

José Álvarez Rogel

2016



**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE
TESIS DOCTORAL POR LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

D^a. MARÍA NAZARET GONZÁLEZ ALCARAZ y D. JOSÉ ÁLVAREZ ROGEL, Directores de la Tesis Doctoral “PROCESOS BIOGEOQUÍMICOS Y ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO DE AGUAS EUTROFIZADAS EN HUMEDALES DEL ENTORNO DEL MAR MENOR: RESULTADOS EXPERIMENTALES EN MESOCOSMOS”.

INFORMAN:

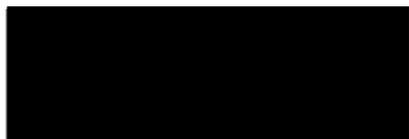
Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por D^a. MARÍA DEL CARMEN TERCERO GÓMEZ, dentro del Programa de Doctorado TÉCNICAS AVANZADAS EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRARIO Y ALIMENTARIO, dando nuestra conformidad para que sea presentada ante el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado para ser autorizado su depósito.

La rama de conocimiento en la que esta Tesis ha sido desarrollada es:

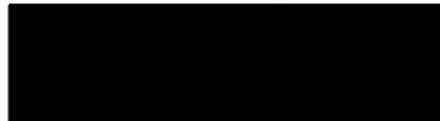
- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 7 de noviembre de 2016

LOS DIRECTORES DE LA TESIS



Fdo.: M^a. Nazaret González Alcaraz



Fdo.: José Álvarez Rogel

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO



CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

D. FRANCISCO ARTÉS HERNÁNDEZ, Presidente de la Comisión Académica del Programa TÉCNICAS AVANZADAS EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRARIO Y ALIMENTARIO,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, “PROCESOS BIOGEOQUÍMICOS Y ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO DE AGUAS EUTROFIZADAS EN HUMEDALES DEL ENTORNO DEL MAR MENOR: RESULTADOS EXPERIMENTALES EN MESOCOSMOS” ha sido realizada, dentro del mencionado Programa de Doctorado, por D^a. MARÍA DEL CARMEN TERCERO GÓMEZ, bajo la dirección y supervisión de la Dra. MARÍA NAZARET GONZÁLEZ ALCARAZ y el Dr. JOSÉ ALVAREZ ROGEL.

En reunión de la Comisión Académica de fecha 08/11/2016, visto que en la misma se acreditan los indicios de calidad correspondientes y la autorización de los Directores de la misma, se acordó dar la conformidad, con la finalidad de que sea autorizado su depósito por el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 8 de noviembre de 2016

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA

FRANCISCO DE
ASIS|ARTES|
HERNANDEZ

Firmado digitalmente por FRANCISCO DE
ASIS|ARTES|HERNANDEZ
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=FRANCISCO DE ASIS|ARTES|HERNANDEZ,
serialNumber=██████████
givenName=FRANCISCO DE ASIS, sn=ARTES
HERNANDEZ, ou=Ciudadanos, c=ACCV, e=ES
Fecha: 2016.11.08 14:09:13 +01:00

Fdo.: FRANCISCO ARTÉS HERNÁNDEZ

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Esta Tesis se ha realizado bajo la financiación del siguiente proyecto:

“Relaciones entre los ciclos biogeoquímicos y la función de los humedales como filtros verdes: efecto de la eutrofización, la especie vegetal y el periodo del año sobre el secuestro de carbono”, cofinanciado por el Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2010–20214) – Fondos FEDER.



Un día,
los enanos se rebelarán
contra Gulliver.

Todos los hombres de corazón diminuto
armados con palos y con hoces
asaltarán al único gigante
con sus pequeños rencores,
con su bilis, con su rabia
de enanos afeitados y miopes.

Pobre de ti, Gulliver, pobre de ti,
el día que todos los enanos
unan sus herramientas y su odio,
sus costumbres, sus vicios, sus carteras,
sus horarios...
no podrán perdonarte que seas alto.

Para ellos la generosidad no es más que un lujo
que no pueden pagarse,
viven alimentados por la envidia que los habita
en forma de costumbre,
míralos revolverse recelosos tras sus gafas de concha,
te acusarán...

de ser el tuerto en el país de los ciegos,
de ser quien habla en el país de los mudos,
de ser el loco en el país de los cuerdos,
de andar en el país de los cansados,
de ser el sabio en el país de los necios,
de ser el malo en el país de los buenos,
de divertirte en el país de los serios,
de estar libre en el país de los presos,
de estar vivo en el país de los muertos,
de ser gigante en el país de los enanos,
de ser la voz que clama en el desierto.

(J. Sabina)

A Blas

... no hay nada mejor que encontrar un amor a medida.

Agradecimientos

De par en par he abierto los balcones, he sacudido el polvo a todos los rincones de mi alma... empezamos pues...

Después de tanto tiempo al fin te has ido y, en vez de lamentarme, he decidido tomármelo con calma... ya llegó el día! y siguiendo con el protocolo empiezo agradeciendo toda su puesta en cuerpo y alma en este trabajo a los directores de Tesis, Pepe y Nazaret.

Pepe, recordarás la primera vez que con su trajín nos juntó la vida, llamaste al timbre para vender libros sobre razas desconocidas... luego te marchaste sin dejar ni un papel con tu nombre y tu dirección,... y volví a encontrarte meses después, la casualidad me cruzó contigo. Gracias por todo, incluido el aguantarme como un padre.

Nazaret, no voy negarte que has marcado estilo, que has patentado un modo de andar sin despeinarte por el agudísimo filo de la navaja de esta empírica Universidad. Gracias por tu iniciativa y tus ganas de trabajar.

A la empresa Pedro Segura S.L., personalmente a Pedro Segura y Juan Moya, por su gran oportunidad y confianza en alguien que no sabía... desnuda se sentía igual que un pez en el agua, vestirla era mejor que amortajarla. Inocente y perversa como un mundo sin dioses, alegre y repartida como el pan de los pobres. Gracias por la oportunidad de pisar más allá de la teoría.

A Isa, que de sobra sabes que eres la primera, que no miento si juro que daría por ti la vida entera. Ni tan arrepentida ni encantada de haberte conocido... porque un despacho sin ti es una emboscada, el pasillo de un tren de madrugada, un laberinto sin luz ni vino tinto, un velo de alquitrán en la mirada. Gracias por poner límites a lo insignificante y ampliar lo importante.

A Héctor, regreso al tiempo en el que te conocí, cuando el mundo acababa en tu jardín, tú eres el cow-boy más duro de La Unión y yo la bailarina del salón. Gracias por tu sentido común y por esas risas día sí, día también... que fácil me lo has hecho ver.

A Duli, que el maquillaje no apague tu risa, que el equipaje no lastre tus alas, que el calendario no venga con prisas, que el diccionario detenga las balas. Gracias por hacerme menos triste y tan afortunada por haberte conocido.

A Antonio "el destructor" porque las mejores promesas son esas que no hay que cumplir y... "viajeros al tren, que nos vamos"... "flaco, pórtate bien, au revoir, buena suerte". Gracias por tu alegría.

A David, mejor persona imposible. Gracias por tu humor.

A Antonio Calderón, M^a Ángeles Ferrer, Antonio López Orenes, M^a José Delgado, Pablo Bielza, Marisa Arce... combatientes de Brunete, braceros de Castellón, los del exilio de fuera y los del exilio interior e infinidad de personas que me ayudaron a mejorar.... Gracias por vuestra sabiduría.

A la Agropandi, la mejor de las agrupaciones de amigos, de buenos amigos y mejores compañeros: a Luis, *mi Luis, Farias para los demás*; a María Dolores, *la Lolica, la bondad personalizada*; a Charo, *mi Charico*; a David, *mi Davidico*; a Miriam, *la Miri, el sentido común de los sentidos*; a Isa, *mi Isa la rubia*; a Raúl, *el Raulico de David... el señor*; a Lis, *Lisita, la madrileña... la mejor de las madrileñas*; a Paco, *el Paquico, el apañero de mi compañero de viaje*; a Esteban, *el gran Esteban... ejemplo de valentía*; a Virginia, *buena gente... perdón por mi boca ¿algún día me perdonarás?*; a Raúl Tárraga, *Raúl T, el compañero de viaje de mi Charico*; a Carolina, *Carol la compañera de mi Luis*; a Raúl Zornoza, *Z, el recién llegado y al que admiro*; a Javi, *el compañero de viaje de mi Isa la rubia*; a

Jesús, *Llopis, un luchador* y a Jorge, *el compañero de Llopis*. Este bálsamo no cura cicatrices, esta rumbita no sabe enamorar, este rosario de cuentas infelices calla más de lo que dice, pero dice la verdad. Gracias, por todo lo que me habéis enseñado y también por todo lo que me habéis corregido.

A Elba y a Paqui dueñas de un corazón tan cinco estrellas, que hasta el hijo de un dios, una vez que las vio, se fue con ellas. Gracias, el rumbo os lo debo a vosotras.

A Blas, porque una casa sin ti es una oficina, un teléfono ardiendo en la cabina, una palmera en el museo de cera, un éxodo de oscuras golondrinas y yo me muero de ganas de decirte que te quiero y que no quiero que venga el destino a vengarse de mí y que prefiero la guerra contigo al invierno sin ti. Gracias cariño.

A mis padres, Jose María y Carmen, porque habéis conseguido que no me caiga fácilmente y que si tropiezo me levante como un ave Fénix. Gracias.

A mis hermanos Jose y Álvaro, que puedo decir de los dos grandes amigos que conocí a los 22 meses y los 8 años de existir... vosotros que no me habéis dejado en la estacada, que habéis soportado mi mal humor, que habéis dado la cara... no puedo escribir sin sentir que me muero sin vosotros. Gracias.

A mis cuñadas Sacra y Alicia... con vosotras aprendí a pedir perdón. Gracias.

A mi sobrina Inés, apenas llegó, se instaló para siempre en mi vida. Gracias, me has hecho la tía más feliz.

A mis tíos Maruja y Félix y a mis primas Nuria y Leticia, a vosotros que ponéis sentido a lo que siento, que le ponéis cariño a lo que quiero y admiración por lo que lucho... si hemos llegado a donde soñábamos es porque vosotros habéis empujado... sin más, muchas gracias por existir en mi vida y en mi corazón. No hay que poner restricción a los cambios... éstos te crecen y te hacen más fuerte.

A mi chache Emilio, porque siempre pienso en ti... y en aquel examen de matemáticas. Gracias, te quiero chache.

A mi familia adoptiva, la que sin preguntas ni respuestas me acogió, me quiso y me quiere como una más. Gracias a mis suegros Blas y Bea, los mejores padres a corta distancia, a la tía Josefa que cuando te veo, eres mi yaya. A mis cuñados Pedro, Sergio, Isa y Alicia, a mis primos Bernardino, Nanda, Antonio, Juani, Raúl, Ani (mi amiga y mi familia), Isabel y Pedro que aunque no te conocí, te conozco. A mis primos de los primos Juani, Juanito, Cristina, Ángel, Pedro, Elisa, José, Carmen, María, Rubén, Sara y Candela. A la tía Mari y al padrino Antonio, y a mis primas Amanda, Cristina y María. Gracias a todos.

A mis abuelos, los mejores, a mi yaya María y mi yayo Bautista... porque si de algo estoy segura es de que TODO, os lo debo a vosotros. Y a jugar por jugar, sin tener que morir o matar, y vivir al revés, que bailar es soñar con los pies. Y soñar con vosotros cada noche, es un regalo que ya sabéis. Muchas gracias.

Así que de momento, nada de adiós muchachos, me duermo en los entierros de mi generación, cada noche me invento, todavía no me emborracho, tan joven y tan vieja, like a rolling stone.

RESUMEN

Los humedales son sistemas capaces de transformar y/o eliminar compuestos nocivos (por ejemplo, nutrientes), depurando las aguas eutrofizadas y/o contaminadas que fluyen a través de los mismos. Este papel como filtros verdes está determinado, fundamentalmente, por procesos biogeoquímicos tales como la desnitrificación, asociados a cambios en las condiciones de oxidación–reducción, así como por la fijación de contaminantes a diversos componentes del suelo, su precipitación y co–precipitación con otros compuestos, e inmovilización en la biomasa vegetal.

La laguna del Mar Menor (SE España), con 135 km² de superficie, es la laguna costera más grande del Mar Mediterráneo. La laguna y sus humedales asociados (por ejemplo, el saladar de la Marina del Carmolí) se encuentran afectados por vertidos de aguas eutrofizadas de origen agrícola y urbano, con altas concentraciones de nitrógeno (N) y fósforo (P). El deterioro de la calidad de las aguas de la laguna se ha acentuado en los últimos años, debido principalmente al aumento del grado de eutrofización, conduciendo a una crisis medioambiental en 2016.

El **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral fue estudiar, en condiciones experimentales, los procesos biogeoquímicos, microbiológicos y fisiológicos en el sistema suelo–agua–planta de humedales del entorno del Mar Menor afectados por aguas eutrofizadas, bajo condiciones alternas de inundación–secado, a fin de determinar en qué medida la presencia de *Phragmites australis*, la carga de nutrientes (carbono orgánico, N y P) y el periodo del año influyen en la capacidad de estos sistemas para depurar aguas eutrofizadas y su relación con la emisión de dióxido de carbono (CO₂) y óxido nitroso (N₂O). Los **objetivos específicos** del trabajo fueron:

1. Evaluar el papel de la carga de nutrientes del agua de inundación y la presencia de *Phragmites australis* en la variabilidad estacional de las propiedades físico–químicas y microbiológicas del suelo, así como de las emisiones de CO₂, en humedales afectados por aguas eutrofizadas.

2. Evaluar la capacidad de eliminación de N de nitrato (N-NO_3^-), así como las emisiones potenciales de N de óxido nitroso ($\text{N-N}_2\text{O}$) del suelo, en humedales afectados por aguas eutrofizadas, y determinar si dichos procesos están condicionados por la carga de nutrientes, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año.
3. Evaluar la capacidad de retención de P en humedales afectados por aguas eutrofizadas y determinar si dicha retención está condicionada por la carga de nutrientes, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año, así como la contribución de las plantas y de diferentes componentes del suelo en la retención de P.

Para alcanzar tales objetivos se realizó, bajo condiciones de invernadero, un experimento en mesocosmos (cajones de metacrilato de 1 m x 0,5 m x 0,5 m) con suelos y plantas (*Phragmites australis*) recogidos en el saladar de la Marina del Carmolí. Los mesocosmos se rellenaron con una capa de ≈ 15 cm de arena (horizonte subsuperficial) y encima de ella ≈ 25 cm de suelo de textura fina (horizonte superficial). Se simuló el comportamiento del humedal en dos situaciones: con *Phragmites australis* y con suelo desnudo, es decir, sin plantas. El experimento consistió en someter a los mesocosmos a condiciones alternas de inundación–secado a lo largo de 12 meses (abril 2012–abril 2013) con agua eutrofizada de baja carga de nutrientes: $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$; $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ amonio (NH_4^+); 6 mg L^{-1} fosfato (PO_4^{3-}) - $1,95 \text{ mg L}^{-1}$ P- PO_4^{3-} - y 10 mg L^{-1} carbono orgánico disuelto (COD) y de alta carga de nutrientes: $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$; $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$; $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ PO}_4^{3-}$ - $19,5 \text{ mg L}^{-1}$ P- PO_4^{3-} - y 100 mg L^{-1} COD. Los tratamientos ensayados fueron: sin planta + baja carga de nutrientes, sin planta + alta carga de nutrientes, *Phragmites* + baja carga de nutrientes, y *Phragmites* + alta carga de nutrientes. Durante 44 semanas se monitorizaron regularmente el potencial redox (Eh), el pH y la temperatura del suelo, así como el CO_2 emitido desde el suelo a la atmósfera; se extrajo y analizó el agua de poro del suelo (conductividad eléctrica, COD, compuestos fenólicos solubles totales, aromaticidad, índice de fluorescencia, nitrógeno disuelto total, N-NO_3^- , N-NH_4^+ y P- PO_4^{3-}); se determinaron las emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo a la atmósfera; se tomaron muestras de suelo y se

analizó el carbono de la biomasa microbiana y el P acumulado en el suelo (incluyendo un procedimiento de fraccionamiento); se midió el estado fisiológico de las plantas de *Phragmites australis* (tasa de fotosíntesis neta y extinción fotoquímica), así como la biomasa vegetal y la concentración de P en planta (raíces, rizomas, tallos y hojas).

En relación al primer objetivo específico, los resultados del experimento mostraron que la carga de nutrientes del agua de inundación y la presencia de plantas de *Phragmites australis* tuvieron un papel diferente en la evolución temporal de las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo relacionadas con los procesos biogeoquímicos, y que este rol estuvo fuertemente influenciado por la profundidad del suelo, la naturaleza de los materiales edáficos y la temperatura. En los horizontes superficiales del suelo, el Eh estuvo marcado por las condiciones alternas de inundación-secado (disminuyó durante las fases de inundación y aumentó en los secados), independientemente de la carga de nutrientes del agua de inundación y de la presencia de plantas. En los horizontes subsuperficiales del suelo, las plantas de *Phragmites australis* contribuyeron a mantener condiciones óxicas, lo que se atribuyó principalmente a la capacidad de dicha especie de canalizar el oxígeno de los tallos a las raíces a través del aerénquima. Esto estuvo modulado por el rendimiento fisiológico de las plantas (medido como actividad fotosintética), que disminuyó durante el mes de agosto debido a las temperaturas extremadamente altas (temperatura del aire ≈ 40 °C y temperatura del suelo $\approx 20-30$ °C), reduciendo su capacidad de airear los suelos, lo que resultó en una disminución de los valores del Eh en profundidad.

La dinámica del pH se atribuyó principalmente al sistema CO_2 -ácido carbónico (H_2CO_3). El pH disminuyó durante las fases de inundación, lo que se atribuyó a la formación de H_2CO_3 , debido al aumento de la presión parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$) al saturarse en agua los poros del suelo, y aumentó durante los secados, al entrar de nuevo oxígeno al suelo. La producción de CO_2 debido a la actividad microbiana del suelo favoreció esta dinámica, que fue más intensa en los horizontes superficiales, mientras que en profundidad ocurrió únicamente en los tratamientos con *Phragmites*

australis. Esto se atribuyó principalmente a la capacidad de los rizomas de las plantas de frenar el aumento de la $p\text{CO}_2$ al introducir oxígeno en los horizontes subsuperficiales. Las oscilaciones de pH descritas se observaron durante los meses con temperaturas del suelo entre ≈ 20 y ≈ 25 °C. Cuando la temperatura del suelo disminuyó por debajo de ≈ 15 °C, las oscilaciones de pH en los horizontes superficiales se atenuaron y las diferencias entre los tratamientos con y sin plantas en profundidad desaparecieron, lo que se atribuyó a una menor actividad microbiana en el suelo y fisiológica de la plantas, debido al descenso de la temperatura.

La actividad de los microorganismos del suelo se estimuló en los meses más cálidos del experimento, tal y como mostró la mayor producción de CO_2 y la mayor aromaticidad y contenido en compuestos fenólicos solubles en el agua de poro del suelo. Esto ocurrió independientemente de la carga de nutrientes del agua de inundación y de la presencia de *Phragmites australis*, aunque la combinación de ambos factores contribuyó a una mayor población microbiana edáfica (mostrada por concentraciones más altas del carbono de la biomasa microbiana del suelo). Debido a esto, la dinámica temporal del carbono orgánico disuelto (en cuanto a cantidad y calidad) se atribuyó principalmente a las variaciones del carbono orgánico procedente del ataque microbiano de la materia orgánica del suelo, con un papel menos relevante de *Phragmites australis*, si es que tuvo alguno.

En relación al segundo objetivo específico, los resultados del experimento mostraron que los mesocosmos experimentales fueron altamente eficaces en la retirada del N del agua eutrofizada. En los horizontes superficiales del suelo se eliminó más del 80 % del N-NO_3^- , independientemente de la carga de nutrientes del agua de inundación, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año. Dicha eliminación estuvo acompañada por emisiones de N gaseoso (medidas como concentraciones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$) del suelo a la atmósfera, de forma más acentuada durante las fases de inundación, poniendo de manifiesto que el proceso de desnitrificación fue el principal mecanismo responsable de la eliminación del N-NO_3^- del agua. En los horizontes subsuperficiales del suelo el N-NO_3^- disminuyó un

promedio del ≈ 83 % en presencia de *Phragmites australis* y un ≈ 32 % sin plantas durante el período más cálido del experimento (temperatura del suelo ≈ 20 – 30 °C), pero la efectividad se redujo a menos de un 10 % durante el período más frío (temperatura del suelo ≈ 10 – 15 °C). Las concentraciones de N-NH_4^+ en el agua de poro del suelo aumentaron durante las fases de inundación, lo que se atribuyó tanto al proceso de amonificación como a la reducción desasimilatoria de NO_3^- a NH_4^+ (DNRA), nitrificándose este NH_4^+ durante las subsiguientes fases de secado. En los tratamientos con *Phragmites australis*, durante las fases de secado, hubo una tendencia a disminuir las emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo, lo que se atribuyó a que las plantas absorbieron el N-NO_3^- recién formado.

En relación al tercer objetivo específico, los resultados del experimento mostraron que los mesocosmos experimentales fueron altamente eficaces en la retirada del P del agua eutrofizada. El P añadido al sistema se redujo en más de un 90 % tanto en el agua de poro del suelo como en el agua de drenaje, independientemente de la carga de nutrientes del agua de inundación, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año. El suelo fue el principal sumidero del P añadido al sistema, mientras que las plantas de *Phragmites australis* tuvieron un papel minoritario. La biomasa de *Phragmites australis* acumuló un promedio del ≈ 27 % del P añadido en los tratamientos con el agua de baja carga de nutrientes, mientras que fue de un ≈ 12 % del P añadido en los tratamientos con el agua de alta carga de nutrientes. Los rizomas fueron los órganos que más contribuyeron a la acumulación de P por las plantas de *Phragmites australis* (≈ 67 – 72 % del P total retenido por las plantas). Los compuestos de Ca/Mg fueron los principales contribuyentes en la retención de P por el suelo, especialmente en los horizontes superficiales (≈ 34 – 53 % del P total en el suelo estaba presente en esta fracción). La presencia de *Phragmites australis* favoreció la retención de P en los óxidos metálicos del suelo (aumento ≈ 12 % del P retenido en la fracción de óxidos metálicos en el tratamiento con agua de alta carga de nutrientes).

En base a los resultados obtenidos y en relación a los objetivos planteados, las **conclusiones generales** de la Tesis Doctoral son:

1. En los horizontes superficiales del suelo, de textura fina, la alternancia de condiciones de inundación–secado fue el principal factor que determinó los cambios de Eh, independientemente del nivel de eutrofización del agua, la presencia de *Phragmites australis* y las variaciones estacionales de temperatura del suelo. Por lo tanto, el potencial microbiológico del suelo fue suficiente para inducir los procesos biogeoquímicos que proporcionan a los humedales la capacidad de actuar como filtros verdes.
2. En concordancia con lo anterior, la eliminación del N-NO_3^- en dichos horizontes superficiales fue igual de eficiente en todos los tratamientos ensayados, siendo la desnitrificación el principal proceso implicado, independientemente del nivel de eutrofización del agua, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año. Las tasas de emisión potencial de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo medidas apoyaron que la desnitrificación fuera el principal mecanismo de retirada del N-NO_3^- del agua eutrofizada. Además, los valores extremadamente bajos de Eh alcanzados tras tres–cuatro semanas de saturación del suelo en agua apuntan a que la reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA) pudo contribuir a la eliminación del N-NO_3^- al final de las fases de inundación.
3. Independientemente de lo expresado en los puntos 1 y 2 en relación a la eficiencia en el proceso de desnitrificación, la actividad microbiana del suelo se vio estimulada con la subida de la temperatura, tal y como mostraron las mayores emisiones de CO_2 del suelo y la mayor aromaticidad y contenido en compuestos fenólicos de la materia orgánica disuelta en el agua de poro a temperaturas del suelo entre ≈ 20 y ≈ 30 °C. Aunque el nivel de eutrofización del agua y la presencia de *Phragmites australis* no jugaron un papel crucial en dicha actividad, sí la favorecieron.

4. Aunque la adición de carbono orgánico disuelto en el agua de inundación estimuló la actividad microbiana del suelo, la dinámica de dicho carbono en el agua de poro sugiere que la principal fuente de carbono y energía utilizada por dichos microorganismos fue la materia orgánica nativa del suelo, independientemente de la presencia de *Phragmites australis*.
5. A diferencia de los horizontes superficiales del suelo, en los horizontes subsuperficiales, de textura arenosa, la presencia de plantas de *Phragmites australis* sí tuvo un papel relevante frenando la disminución del Eh, lo que pudo atribuirse a la capacidad de dicha especie para introducir oxígeno en el suelo a través del aerénquima. Dado que la capacidad de aireación está relacionada con la actividad fisiológica de las plantas, ésta se vio perjudicada cuando dicha actividad disminuyó debido a las altas temperaturas del verano (≈ 40 °C).
6. *Phragmites australis*, además de tener un papel relevante en la biogeoquímica de los horizontes subsuperficiales arenosos, también lo tuvo en la eliminación del N-NO₃⁻ en profundidad. Las plantas contribuyeron a una depuración más rápida del agua de poro de los horizontes subsuperficiales durante las fases de secado al absorber el N-NO₃⁻ formado por nitrificación a partir del N-NH₄⁺ acumulado durante las fases de inundación.
7. Los horizontes superficiales del suelo fueron los principales sumideros de P en los humedales ensayados, quedando éste retenido, principalmente, en compuestos de Ca/Mg, independientemente del nivel de eutrofización del agua, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año. Las plantas tuvieron un papel secundario, favoreciendo la retención de P en los óxidos metálicos y acumulándolo en partes aéreas y subterráneas.

SUMMARY

Wetlands have the capacity to transform and/or remove harmful compounds (e.g. nutrients), improving the quality of eutrophic and/or contaminated waters flowing through them. Their role as green filters mainly depend on the biogeochemical processes related to the changes in the oxidation–reduction conditions, such as denitrification, as well as on the fixation of contaminants to various soil components, their precipitation or co–precipitation with other substances and their immobilization in plant biomass.

The Mar Menor lagoon (SE Spain), with 135 km² of surface area, is the largest coastal lagoon of the Mediterranean basin. The lagoon and its associated wetlands (e.g. Marina del Carmolí salt marsh) are affected by eutrophic waters of agricultural and urban origin, with high loads of nitrogen (N) and phosphorus (P). The water quality deterioration of the lagoon has increased in the last years, mainly due to its eutrophication, leading to an environmental crisis in 2016.

The **general objective** of the PhD Thesis was to study, under experimental conditions, the biogeochemical, microbiological and physiological processes in the soil–water–plant system of the Mar Menor's wetlands affected by eutrophic waters, under alternating flooding–drying conditions, in order to assess to what extent the presence of *Phragmites australis*, the nutrient load (organic carbon, N and P) and the time of the year influence the capacity of these systems to depurate eutrophic waters and its relation to carbon dioxide (CO₂) and nitrous oxide (N₂O) emissions. The **specific objectives** of the work were:

1. To evaluate the role of the nutrient load of the flooding water and the presence of *Phragmites australis* in the seasonal variability of the physico–chemical and microbiological soil properties, as well as of the CO₂ emissions, in wetlands affected by eutrophic waters.

2. To evaluate the N–NO₃⁻ removal capacity, as well as the potential soil N–N₂O emissions, in wetlands affected by eutrophic waters, and to assess if these processes are determined by the nutrient load, the presence of *Phragmites australis* and the time of the year.
3. To evaluate the P retention capacity in wetlands affected by eutrophic waters and to assess if such retention is determined by the nutrient load, the presence of *Phragmites australis* and the time of the year, as well as the contribution of the plants and the different soil components in the retention of P.

To achieve these objectives, an experiment with methacrylate mesocosms (1 m x 0.5 m x 0.5 m) was performed under greenhouse conditions with soils and plants (*Phragmites australis*) collected from the Marina del Carmolí salt marsh. The mesocosms were filled with ≈15 cm of sand at the bottom (subsurface horizon) and with ≈25 cm of fine textured soil above the sand (surface horizon). The behavior of the salt marsh was simulated under two situations: with *Phragmites australis* and with bare soil, i.e. without plants. The mesocosms were subjected to alternating flooding–drying conditions for 12 months (April 2012–April 2013) with eutrophic water of low nutrient load: 20 mg L⁻¹ NO₃⁻; 0.5 mg L⁻¹ ammonium (NH₄⁺); 6 mg L⁻¹ phosphate (PO₄³⁻) - 1.95 mg L⁻¹ P–PO₄³⁻- and 10 mg L⁻¹ dissolved organic carbon (DOC) and high nutrient load: 200 mg L⁻¹ NO₃⁻; 5 mg L⁻¹ NH₄⁺; 60 mg L⁻¹ PO₄³⁻ -19.5 mg L⁻¹ P–PO₄³⁻- and 100 mg L⁻¹ DOC. The treatments assayed were: no plant + low nutrient load, no plant + high nutrient load, *Phragmites* + low nutrient load, and *Phragmites* + high nutrient load. For 44 weeks soil redox potential (Eh), pH and temperature were regularly monitored, as well as the soil CO₂ emissions to the atmosphere; porewater samples were extracted and analyzed (electrical conductivity, dissolved organic carbon, total soluble phenolic compounds, aromaticity, fluorescence index, total dissolved nitrogen, N–NO₃⁻, N–NH₄⁺ and P–PO₄³⁻); soil potential N–N₂O emissions to the atmosphere were determined; soil samples were extracted and analyzed for microbial biomass carbon content and accumulated P (including a fractionation procedure); *Phragmites australis* physiological status was measured (net photosynthesis rate and photochemical quenching), as well

as the vegetal biomass and the P content in the plant (roots, rhizomes, stems and leaves).

In relation to the first specific objective, the results showed that the nutrient load of the flooding water and the presence of *Phragmites australis* had a different role in the temporal evolution of the physico–chemical and microbiological soil properties related to the biogeochemical processes, and that this role was strongly influenced by the soil depth, the nature of the soil materials and the temperature. In the surface soil horizons, the redox potential was influenced by the existence of alternating flooding–drying conditions (it decreased during the flooding phases and increased during the drying ones), regardless of the nutrient load of the flooding water and the plant presence. In the subsurface soil horizons, *Phragmites australis* contributed to maintain oxic conditions, which were mainly attributable to the capacity of this species to conduct oxygen from the shoots to the roots via aerenchyma. The latter was modulated by the physiological performance of the plant (measured as photosynthetic activity), which decreased during August due to the extremely high temperatures reached (air temperature ≈ 40 °C and soil temperature ≈ 20 – 30 °C), leading to a decrease of its capacity to aerate the soils that resulted in a drop of the Eh values in depth.

The pH dynamic was mainly attributable to the CO₂–carbonic acid (H₂CO₃) system. The pH values decreased during the flooding phases, which was attributable to the formation of H₂CO₃ due to an increase of the CO₂ partial pressure (pCO₂) when the soil pores were saturated in water, while they increased during the drying phases, when oxygen penetrated again into the soil. This dynamic was favored by the CO₂ production due to the soil microbial activity, which was more intense in the surface soil horizons, while in depth it only occurred in the treatments with *Phragmites australis*. The latter was mainly attributable to the capacity of the plant rhizomes to slowdown the increasing pCO₂ by promoting oxygen diffusion into the subsurface soil horizons. These pH oscillations were shown during the months with soil temperatures between ≈ 20 and 25 °C. When the soil temperature decreased below 15 °C, the pH oscillations in the

surface soil horizons were attenuated and the differences between the treatments with and without plants in the subsurface soil horizons disappeared, which was attributable to a lower soil microbial activity and plant physiological activity with the temperature drop.

The activity of the soil microorganisms was stimulated in the warmest months of the experiment, as shown by the larger CO₂ production and higher aromaticity and phenolic compounds content in pore water. The latter occurred regardless of the nutrient load of the flooding water and the presence of *Phragmites australis*, although the combination of these two factors contributed to greater soil microbial population (shown by the higher microbial biomass carbon concentrations). Due to that, the temporal dynamic of the dissolved organic carbon (quantity and quality) was mainly attributable to the variations of organic carbon from microbial attack to native soil organic matter, with *Phragmites australis* playing a minor role, if any.

In relation to the second specific objective, the results showed that the experimental mesocosms were highly effective in the removal of N from the eutrophic flooding water. In the surface soil horizons more than 80 % of N-NO₃⁻ was removed, regardless of the nutrient load of the flooding water, the presence of *Phragmites australis* and the time of the year. Such removal was accompanied by N gas emissions (measured as potential N-N₂O concentrations) from the soil to the atmosphere, especially during the flooding phases, pointing that denitrification process was the main responsible of N-NO₃⁻ removal from the eutrophic flooding water. In the subsurface soil horizons N-NO₃⁻ decreased an average of ≈83 % in presence of *Phragmites australis* and ≈32 % without plants during the warmest period of the experiment (soil temperature ≈20–30 °C), but the effectiveness was reduced to less than 10 % during the coldest months (soil temperature ≈10–15 °C). The porewater N-NH₄⁺ concentrations increased during the flooding phases, which was attributable to both ammonification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA); N-NH₄⁺ was nitrified during the following drying phases. A tendency to lower potential

soil N–N₂O emissions was observed in the treatments with *Phragmites australis* during the drying phases, pointing that the plants absorbed this newly formed N–NO₃⁻.

In relation to the third specific objective, the results showed that the experimental mesocosms were highly effective in the removal of P from the eutrophic flooding water. There was a reduction of more than 90 % of the P added to the system both in the soil pore water and the drainage water, regardless of the nutrient load of the flooding water, the presence of *Phragmites australis* and the time of the year. The soil was the main sink of the P added to the system, while *Phragmites australis* had a minor role. *Phragmites australis* biomass accumulated an average of ≈27 % of the P added with the low nutrient load water while ≈12 % of P in that of high nutrient load. The rhizomes were the organs that contributed the most to the retention of P by *Phragmites australis* (≈67–72 % of the total P retained by the plants). Calcium/magnesium compounds were the main contributors to the retention of P in the soil compartment, especially in the surface soil horizons (≈34–53 % of the total P in the soil was present in this fraction). *Phragmites australis* favored the retention of P onto metal oxides (≈12 % increase of the P retained in the metal oxides fraction in the treatment with water of high nutrient load).

Based on the obtained results and in relation to the proposed objectives, the **general conclusions** of the PhD Thesis are:

1. In the surface fine-textured soil horizons, the existence of alternating flooding–drying conditions was the key factor determining the Eh oscillations, regardless of the water eutrophic level, the presence of *Phragmites australis* and the temporal variations of the soil temperature. Therefore, the intrinsic microbial potential of the soil was enough to induce the biogeochemical processes that provide wetlands their capacity to act as green filters.
2. In accordance with the latter statement, the N–NO₃⁻ removal in the surface soil horizons was equally effective in all the treatments assayed, denitrification process

being the main mechanism involved, regardless of the water eutrophic level, the presence of *Phragmites australis* and the time of the year. The potential soil N–N₂O emission rates measured supported that denitrification was the main mechanism involved in N–NO₃[−] removal from the eutrophic flooding water. In addition, the extremely low Eh values reached after three–four weeks of soil saturation in water pointed that dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) could contribute to N–NO₃[−] removal at the end of the flooding phases.

3. Regardless of the statements in points 1 and 2 in relation to the efficiency of the denitrification process, soil microbial activity was favored with increasing temperature, as shown by the greater soil CO₂ emissions and the higher aromaticity and phenolic compounds content of the porewater dissolved organic matter with soil temperatures between ≈20 and 30 °C. Even if the water eutrophic level and the presence of *Phragmites australis* did not have a crucial role in this activity, they both favored it.
4. Even though the addition of dissolved organic carbon to the eutrophic flooding water stimulated the microbial activity of the soil, the dynamic of the porewater dissolved organic carbon suggests that the main source of carbon and energy used by microorganisms was the soil native organic matter, regardless of the presence of *Phragmites australis*.
5. Unlike the surface soil horizons, in the subsurface sandy horizons, *Phragmites australis* had a key role slowing down the drop of the Eh values, which could be attributable to the capacity of this species to introduce oxygen into the soil through the aerenchyma. Since the aeration capacity is related to the physiological activity of the plants, such capacity was damaged when the vegetal activity decreased due to the high summer temperatures (≈40 °C).
6. In addition to the relevant role of *Phragmites australis* in the biogeochemistry of the subsurface sandy horizons, it also had a key role in N–NO₃[−] removal in depth.

The plants contributed to a faster depuration of the pore water in the subsurface horizons during the drying phases, absorbing the N-NO_3^- formed by nitrification from the N-NH_4^+ accumulated during the flooding phases.

7. The surface soil horizons were the main P sinks in the assayed wetlands, P being mainly retained by the Ca/Mg compounds, regardless of the water eutrophic level, the presence of *Phragmites australis* and the time of the year. The plants had a secondary role, favoring P retention onto metal oxides and accumulating it both in above and belowground biomass.

ÍNDICE

PARTE I. ASPECTOS GENERALES Y METODOLOGÍA

CAPÍTULO 1. Introducción.....	1
1.1 Definición de humedales y papel que desempeñan en la biosfera.....	3
1.2 Características generales de los suelos de los humedales.....	7
1.3 Síntesis de las reacciones de oxidación–reducción (redox) en los suelos hidromorfos.....	8
1.4 Características generales de la vegetación de los humedales.....	12
1.4.1 Adaptaciones morfológicas al medio acuático y a niveles altos de salinidad.....	13
1.4.2 <i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud.....	16
1.5 Ciclos y transformaciones de los nutrientes en los humedales.....	17
1.5.1 Dinámica del nitrógeno (N) en humedales.....	18
1.5.2 Dinámica del fósforo (P) en humedales.....	22
1.6 Eutrofización en humedales.....	25
1.7 El papel de los humedales como filtros verdes.....	26
1.8 Emisión de gases de efecto invernadero (GEI) en humedales.....	28
1.8.1 Óxido nitroso (N ₂ O).....	29
1.8.2 Dióxido de carbono (CO ₂).....	30
1.9 El carbono de la biomasa microbiana (CBM) como indicador de la microbiología del suelo.....	31
1.10 Bibliografía.....	31
CAPÍTULO 2. Área de estudio.....	43
2.1 La laguna del Mar Menor.....	45
2.1.1 Leyes, normativas y figuras de protección medioambiental.....	47
2.1.2 Principales impactos sobre la laguna del Mar Menor y su entorno.	49
2.1.2.1 Impactos de las actividades agrícolas.....	50
2.1.2.2 Impactos ocasionados por el crecimiento de la población y el turismo.....	52
2.1.2.3 Impactos de las actividades mineras.....	53
2.1.3 La laguna del Mar Menor en 2016.....	54
2.2 El saladar de la Marina del Carmolí.....	57
2.2.1 Localización.....	57
2.2.2 Cursos de agua.....	58
2.2.3 Suelo y vegetación.....	59
2.2.4 Usos del saladar.....	60
2.2.5 Impactos en el saladar.....	61
2.3 Bibliografía.....	62

CAPÍTULO 3. Antecedentes y objetivos del trabajo.....	71
3.1 Antecedentes.....	73
3.2 Objetivos y diseño experimental.....	74
3.3 Bibliografía.....	77
CAPÍTULO 4. Material y métodos.....	81
4.1 Recogida de muestras de suelo y planta.....	83
4.2 Construcción y equipamiento de los mesocosmos en invernadero.....	85
4.3 Tratamientos ensayados y desarrollo del experimento.....	90
4.4 Recogida de muestras y monitorización de condiciones físico-químicas del suelo.....	92
4.4.1 Muestras recogidas y parámetros medidos al inicio y final del experimento.....	92
4.4.2 Muestras recogidas y parámetros medidos regularmente a lo largo del experimento.....	92
4.4.3 Procedimiento para la toma de datos y muestras.....	97
4.5 Métodos de análisis de las muestras.....	104
4.5.1 Análisis de los suelos.....	104
4.5.1.1 Parámetros físicos y físico-químicos.....	104
4.5.1.2 Carbono de la biomasa microbiana (CBM).....	108
4.5.2 Análisis del agua de poro y los drenajes.....	109
4.5.3 Análisis del óxido nitroso (N ₂ O) emanado desde el suelo.....	111
4.5.4 Análisis de las plantas de <i>Phragmites australis</i>	112
4.6 Análisis estadístico.....	112
4.7 Bibliografía.....	112

PARTE II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 5. Comportamiento biogeoquímico del suelo

Respuesta de los procesos biogeoquímicos del sistema suelo-agua-planta a condiciones experimentales de inundación-secado en un humedal eutrofizado: papel de *Phragmites australis*.....

	119
5.1 Introducción y objetivo específico.....	122
5.2 Material y métodos.....	124
5.3 Resultados.....	125
5.3.1 Cambios de potencial redox (Eh), pH y temperatura.....	125
5.3.2 Cambios de carbono orgánico disuelto (COD), dióxido de carbono (CO ₂) y carbono de la biomasa microbiana (CBM).....	130
5.3.3 Condiciones fisiológicas de las plantas de <i>Phragmites australis</i>	134
5.4 Discusión.....	137
5.4.1 Cambios temporales de la condiciones biogeoquímicas en los	

horizontes superficiales del suelo.....	137
5.4.2 Cambios temporales de las condiciones biogeoquímicas en los horizontes subsuperficiales del suelo.....	142
5.5 Conclusiones.....	146
5.6 Agradecimientos.....	147
5.7 Bibliografía.....	148

CAPÍTULO 6. Dinámica del nitrógeno

Eliminación de nitratos y emisiones potenciales de N ₂ O del suelo en saladares eutrofizados con y sin <i>Phragmites australis</i>	153
6.1 Introducción y objetivo específico.....	156
6.2 Material y métodos.....	158
6.3 Resultados.....	159
6.3.1 Concentraciones de N-NO ₃ ⁻ y N-NH ₄ ⁺ en el agua de poro y drenajes.....	159
6.3.2 Emisiones potenciales de N-N ₂ O del suelo.....	164
6.4 Discusión.....	167
6.4.1 Factores que influyen en las transformaciones del nitrógeno (N)....	167
6.4.2 Eficacia en la eliminación de N-NO ₃ ⁻ , emisiones potenciales de N-N ₂ O del suelo y gestión del saladar.....	174
6.5 Conclusiones.....	177
6.6 Agradecimientos.....	178
6.7 Bibliografía.....	178

CAPÍTULO 7. Dinámica del fósforo

Retención y fraccionamiento de fósforo en un humedal eutrofizado: un año de experimento en mesocosmos bajo condiciones de fluctuación en la inundación.....	187
7.1 Introducción y objetivo específico.....	190
7.2 Material y métodos.....	192
7.3 Resultados.....	194
7.3.1 Concentraciones de P-PO ₄ ³⁻ en el agua de poro del suelo y en los drenajes.....	194
7.3.2 Biomasa de <i>Phragmites australis</i> y acumulación de fósforo (P) en las plantas.....	197
7.3.3 Concentraciones de fósforo (P) en los suelos.....	199
7.4 Discusión.....	204
7.4.1 Eliminación del fósforo (P) del agua eutrofizada de inundación.....	204
7.4.2 Biomasa de <i>Phragmites australis</i> y distribución del fósforo (P) en las plantas.....	205
7.4.3 Fraccionamiento del fósforo (P) en los suelos.....	207

7.5	Conclusiones y recomendaciones de manejo.....	209
7.6	Agradecimientos.....	210
7.7	Bibliografía.....	210

PARTE III. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 8. Conclusiones generales y consideración para el uso de humedales para prevenir la eutrofización de la laguna del Mar Menor.....			219
8.1	Conclusiones generales.....		221
8.2	Consideraciones para el uso de humedales para prevenir la eutrofización de la laguna del Mar Menor.....		223
8.2.1	Humedales y usos del territorio.....		223
8.2.2	Aspectos específicos a considerar sobre la construcción de humedales en el Campo de Cartagena.....		225

PARTE I

ASPECTOS GENERALES Y METODOLOGÍA

CAPÍTULO 1

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN DE HUMEDALES Y PAPEL QUE DESEMPEÑAN EN LA BIOSFERA

Los humedales poseen una elevada diversidad biológica y son unos de los ecosistemas más productivos de la biosfera. (Mitsch y Gosselink, 1993).

Por su carácter fronterizo entre los ecosistemas terrestres y acuáticos, existe pluralidad de criterios (ecológicos, proteccionistas o cartográficos) sobre qué debe ser considerado como humedal. Así, hay numerosas definiciones al respecto, dada la gran diversidad de hábitats que aparecen en ellos y sus peculiaridades en diferentes partes del mundo.

Bajo un criterio ecológico, González Bernáldez (1988) elaboró la siguiente definición: *un humedal es cualquier unidad funcional del paisaje, que no siendo ni un río, ni un lago, ni el medio marino, constituye, tanto espacial como temporalmente, una anomalía hídrica positiva en relación con un territorio adyacente más seco.*

El Convenio Ramsar sobre humedales, puesto en marcha en Irán en 1971, es un tratado intergubernamental que defiende la conservación y el uso racional de los humedales y los define en base a un carácter proteccionista. Según este convenio, se consideran humedales *las extensiones de marismas, pantanos, turberas o superficies cubiertas de agua, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros. Además, podrán comprender zonas de bordes fluviales o de costas adyacentes al propio humedal, así como las islas o extensiones de agua marina de una profundidad superior a los seis metros en marea baja, cuando se encuentren dentro del humedal.* Esta definición es aceptada internacionalmente y se caracteriza por incluir un amplio abanico de hábitats acuáticos (incluyendo marismas, ríos, lagos, lagunas, deltas, zonas marinas, embalses, canales, etc.), e incluso algunos hábitats que no se pueden considerar estrictamente acuáticos, como islas, playas y otras zonas costeras.

Una definición utilizada desde un punto de vista cartográfico es la del Fish and Wildlife Service de los Estados Unidos, el cual considera a los humedales como *terrenos transicionales entre sistemas terrestres y acuáticos en los que el nivel freático está usualmente en la superficie o cerca de ésta, o el terreno está cubierto por una estrecha lámina de agua* (Mausbach y Blake-Parker, 2001). Según esta definición, los humedales deben tener uno o más de los siguientes atributos:

- El terreno debe estar ocupado por especies vegetales hidrófitas (plantas adaptadas a medios muy húmedos o acuáticos), al menos temporalmente.
- El sustrato debe ser predominantemente un suelo hídrico no drenado.
- El sustrato puede no ser considerado un suelo (puede ser una gravera, roca, coral, etc.) y debe estar saturado en agua o cubierto por una estrecha lámina de agua algún tiempo durante la estación de crecimiento de las especies biológicas cada año.

De estos puntos se deduce que un humedal debe de tener un cierto grado de saturación en agua o encharcamiento, una vegetación adaptada a ambientes inundados y suelos hídricos.

Por otra parte, a veces se considera a los humedales como ecotonos, que son *zonas de transición o tensión entre dos o más comunidades, desde el punto de vista de la resistencia/tolerancia a las condiciones físicas (pH, salinidad, humedad, etc.) o de la competencia por los recursos (nutrientes, agua, etc.)* (Tiner, 1999). Bajo este punto de vista, no queda claro si la mayoría de los humedales son ecotonos que tenderán a convertirse con el tiempo en zonas de tierra firme. En el interior de un humedal sí pueden aparecer zonas de transición debido a la existencia de gradientes ambientales, fundamentalmente edáficos (como los originados por las variaciones de salinidad e hidromorfía), que llevarían a una zonación de las comunidades vegetales. A pesar de esta zonación, los humedales pueden ser considerados como ecosistemas relativamente estables en el tiempo que no tienen necesariamente que convertirse en

un medio únicamente terrestre a menos que la hidrología sea modificada por el hombre (directa o indirectamente), por un cambio climático o por otros eventos catastróficos (Tiner, 1999).

El Convenio Ramsar (Ramsar, 2001) destaca la importancia de los humedales por su contribución en:

- **Control de inundaciones:** los humedales suelen desempeñar una función crítica en el control de las inundaciones, ya que gracias al agua retenida en las llanuras de inundación se ralentiza la velocidad del flujo lo que reduce los daños causados aguas abajo. La destrucción de dichas llanuras inundables para destinarlas a la agricultura o al poblamiento humano ha reducido esta capacidad. La construcción de muros de contención y represas en los ríos para mejorar el control de las crecidas tiene con frecuencia el efecto opuesto, ya que si el agua acumulada llega a desbordarse lo hace con gran virulencia causando graves daños allí por donde pasa. La restauración de llanuras inundables y la demolición de estructuras está contribuyendo a resolver este problema en muchos países.
- **Reservorios de biodiversidad:** más del 40 % de las especies de animales y plantas del mundo y el 12 % de todas las especies animales se hallan en los humedales de agua dulce.
- **Depuración de aguas:** las plantas y los suelos de los humedales desempeñan una función importante como filtros verdes en la depuración de aguas, eliminando altas concentraciones de nutrientes disueltos como nitrógeno (N) y fósforo (P) y contribuyendo a disminuir el riesgo de eutrofización (fenómeno por el que se produce un excesivo crecimiento de ciertos organismos acuáticos que conlleva una pérdida de oxígeno (O₂) disuelto y, por tanto, una disminución de la calidad del agua). En este sentido, es común la construcción de humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales por su alta efectividad depuradora.

- Estabilización de costas y protección contra tormentas: los humedales costeros desempeñan una función crítica en muchas partes del mundo en la protección de la tierra contra las mareas de tormenta y otros fenómenos climáticos, al reducir la fuerza del viento, las olas y las corrientes. Las raíces de las plantas de los humedales se entrelazan y proporcionan cohesión a la costa, ofreciendo resistencia ante la erosión eólica y marina.
- Retención de sedimentos y nutrientes: los humedales aminoran el paso del agua y estimulan la deposición de nutrientes, sustancias tóxicas y sedimentos acarreados por ella. La retención de nutrientes en los humedales hace que ellos sean uno de los ecosistemas más productivos, compitiendo incluso con los sistemas de agricultura intensiva. La supervivencia de los deltas costeros depende de los sedimentos y nutrientes transportados por los cursos de agua. Los deltas pueden ser degradados por las estructuras de ingeniería que entorpecen la circulación natural de dichos sedimentos y nutrientes.
- Recarga de acuíferos: el agua que se acumula en los humedales contribuye a recargar acuíferos subterráneos, que almacenan el 97 % de las aguas dulces no congeladas del mundo. Además de recargar los acuíferos, el agua se purifica al atravesar el suelo hasta llegar al subsuelo. Las aguas subterráneas revisten una importancia crítica para miles de millones de personas como única fuente de agua potable y de muchos programas de regadío.
- Mitigación del cambio climático: puede que los humedales almacenen hasta el 40 % del carbono (C) terrestre mundial; las turberas y los humedales arbolados son sumideros de C particularmente importantes. La conversión de humedales para uso agropecuario y su destrucción liberan grandes cantidades de dióxido de carbono (CO₂), el gas responsable de, por lo menos, el 60 % del efecto de aumento de la temperatura mundial.

- Valor cultural: con frecuencia los humedales revisten importancia religiosa, histórica, arqueológica o por otros motivos culturales en el plano local o nacional, pese a lo cual es un tema esencialmente inexplorado y mal documentado.
- Valor recreativo–turístico: muchos humedales son lugares de destino turístico de primer orden. Algunos de los más notables están protegidos como parques nacionales, bienes del patrimonio mundial, sitios Ramsar o reservas de la biosfera. Muchos humedales generan ingresos apreciables a nivel local y nacional. Millones de personas practican actividades recreativas como la pesca, la caza, la vela, etc.

1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SUELOS DE LOS HUMEDALES

La característica que mejor puede identificar a los suelos de los humedales es la hidromorfía o el estado permanente o temporal de saturación en agua del suelo que lleva asociada la existencia de condiciones anaerobias (Tiner, 1999). Por otra parte, el Comité Técnico Nacional de Suelos Hídricos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (NTCHS–USDA) utiliza el término suelo hídrico y lo define como *un suelo formado bajo condiciones de saturación o encharcamiento durante tiempo suficiente en la estación de crecimiento de los organismos para desarrollar condiciones anaerobias en su parte superior* (Mausbach y Blake-Parker, 2001).

Cuando un suelo se satura en agua el nivel de O_2 disminuye hasta valores muy bajos. Esto provoca que el O_2 pueda agotarse con relativa facilidad si los microorganismos lo utilizan como aceptor final de electrones (e^-) en el proceso de consumo de la materia orgánica. Cuando el O_2 libre se agota se puede llegar a condiciones anaerobias. Aun así, un suelo puede estar saturado y no existir condiciones de anaerobiosis por las siguientes razones:

- Temperaturas < 1 °C que impiden la actividad de los microorganismos que son los que consumen el O_2 .

- Ausencia de materia orgánica, ya que sin un sustrato que consumir, los microorganismos no agotarían el O₂.
- Movimiento suficiente del agua que satura el suelo como para permitir su oxigenación.
- Elevados contenidos en carbonato cálcico (CaCO₃) y/o sódico (Na₂CO₃) que elevan el pH, lo que desplaza las reacciones de oxidación–reducción (redox) hacia la oxidación.

Se habla de saladares cuando los suelos y las aguas de los humedales tienen salinidad. Se consideran suelos halomorfos o salinos aquellos en los que existe una acumulación de sales tan elevada que interfiere en el correcto crecimiento de las plantas no especializadas. En consecuencia, las especies vegetales que se desarrollan en los saladares cuentan con adaptaciones específicas para tolerar la salinidad. Un suelo se considera salino cuando tiene un valor de conductividad eléctrica (CE) del extracto de saturación $> 2 \text{ dS m}^{-1}$ (Richards, 1974). Se habla de suelos sódicos cuando la concentración de sodio en el complejo de cambio es elevada ($> 15 \%$), y pueden ser a su vez salinos o no, dependiendo de su valor de CE. Un suelo alcalino tiene un pH $> \approx 8,7$ y puede ser, a su vez, salino o sódico en función de su CE y porcentaje de sodio de cambio (PSC).

1.3. SÍNTESIS DE LAS REACCIONES DE OXIDACIÓN–REDUCCIÓN (REDOX) EN LOS SUELOS HIDROMORFOS

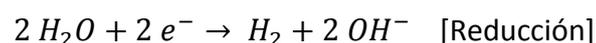
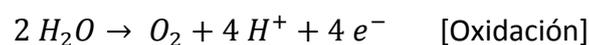
Las reacciones químicas de los suelos y sedimentos implican transferencias de e⁻ y protones (H⁺) (Baas Becking *et al.*, 1960). La oxidación ocurre cuando hay una pérdida de e⁻ en ese proceso de transferencia, mientras que la reducción ocurre cuando hay una ganancia de e⁻. La especie oxidante es la aceptora de e⁻, y por tanto la que se reducirá en el proceso, mientras que la especie reductora es la que los cede, y por tanto se oxidará. Los e⁻ no están libres en la solución del suelo, luego el agente oxidante y el reductor deben estar en íntimo contacto (Sparks, 2003). La medida de la

disponibilidad de e^- en estas reacciones se realiza a través del potencial redox (Eh) (Patrick *et al.*, 1996). El Eh se mide en voltios (V), aunque se expresa normalmente en milivoltios (mV) debido a que suele tener valores muy bajos.

En los suelos hidromorfos se presentan procesos redox derivados del encharcamiento que favorece la pérdida de O_2 . El Eh varía dependiendo de las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas del sistema y del valor de pH (Vepraskas y Faulkner, 2001; Kirk, 2004). Según Vepraskas y Faulkner (2001) y Otero y Macías (2003), el estado de los suelos, a un pH neutro (7) se puede clasificar atendiendo al valor de Eh como:

- Óxico: valor de Eh $> \approx +300$ mV. Son los suelos donde predomina la reducción del O_2 .
- Subóxico: valor de Eh comprendido entre $\approx +100$ y $\approx +300$ mV. Son los suelos donde se puede producir la reducción del ión nitrato (NO_3^-), mangánico (Mn^{4+}) y del férrico (Fe^{3+}).
- Anóxico: valor de Eh $< \approx +100$ mV. En ellos se puede producir la reducción del ión sulfato (SO_4^{2-}) y, en caso extremo, del CO_2 .

Normalmente, las reacciones redox vienen acompañadas de cambios de pH en el medio. Esto ocurre, por ejemplo, en los procesos de oxidación y reducción del agua (H_2O):



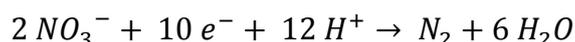
[Ecuación 1.1]

Estas reacciones muestran cómo la oxidación del H_2O acidifica el medio debido a la producción de iones H^+ , mientras que su reducción lo basicifica al generarse iones OH^- (hidroxilos).

La materia orgánica es la principal fuente de e^- . Cuando ésta se oxida, los e^- liberados son empleados en reacciones de reducción. El O_2 es el principal aceptor de e^- para los microorganismos. Cuando el O_2 comienza a agotarse, algunos microorganismos empiezan a usar otros aceptores de e^- inorgánicos en la respiración empezando por el NO_3^- , seguido del Mn^{4+} , del Fe^{3+} , del SO_4^{2-} y, por último, del CO_2 (Vepraskas y Faulkner, 2001). Esto es debido a que la energía obtenida por la oxidación de un donador de e^- como el O_2 es mayor que la obtenida por la de un donador de e^- como el NO_3^- y a su vez ésta es mayor que la obtenida si se utiliza el Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} o el CO_2 , siguiendo el orden desde más electronegativo (O_2) a más electropositivo (CO_2) (Madigan *et al.*, 1997). Por tanto, los microorganismos empezarán a usar aceptores de e^- desde el más electronegativo al más electropositivo. Debido a que la descomposición anaerobia es más lenta que la aerobia, los suelos hidromorfos tienden a acumular materia orgánica escasamente mineralizada.

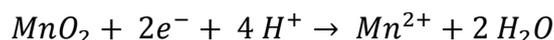
De entre las reacciones de reducción que se pueden producir en los suelos destacan, según Vepraskas y Faulkner (2001) y Craft (2001), las siguientes:

- La reducción del ión NO_3^- , o desnitrificación, que comprende la siguiente reacción global:



[Ecuación 1.2]

- La reducción del ión Mn^{4+} , o manganeso-reducción, da como resultado el ión manganeso (Mn^{2+}) que es soluble en H_2O y por tanto puede ser movilizado disuelto en la solución del suelo. La reacción se produce según la siguiente reacción:



[Ecuación 1.3]

- La reducción del ión Fe^{3+} da como resultado el ión ferroso (Fe^{2+}), que es soluble en H_2O e incoloro. Así, cuando se da este proceso el suelo pasa de tener un aspecto rojizo y/o anaranjado debido al Fe^{3+} a adquirir un aspecto grisáceo debido a la decoloración. El Fe^{2+} , al ser soluble, puede emigrar del perfil del suelo arrastrado

por el H₂O que circula por sus poros. La reacción se produce según la siguiente reacción:



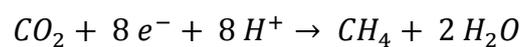
[Ecuación 1.4]

- La reducción del ión SO₄²⁻, o sulfato-reducción, da como resultado la formación del ión hidrógenosulfuro (HS⁻), el cual puede reaccionar con el hidrógeno (H) para formar ácido sulfhídrico (H₂S) o bien combinarse con los metales solubles presentes en la solución del suelo para formar sulfuros metálicos tales como sulfuro de zinc (ZnS), sulfuro de plomo (PbS) o sulfuro de hierro, pirita (FeS₂). Se realiza por bacterias anaerobias estrictas. La reacción se produce según la siguiente reacción:



[Ecuación 1.5]

- La reducción del CO₂ a metano (CH₄), o metanogénesis, se produce en condiciones de reducción extremas a partir de Eh ≤ ≈-250 mV a pH = 7. Las bacterias metanogénicas son anaerobias estrictas y la reacción se produce según la siguiente reacción:



[Ecuación 1.6]

Así mismo, se ha documentado la posible producción de gas fosfano (PH₃) mediante la reducción microbiológica de fosfato en unos pocos ambientes con condiciones de extrema reducción (Dévai *et al.*, 1988; Gassman y Glindemann, 1993).

Es importante destacar el concepto de competencia entre aceptores de e⁻ en suelos encharcados. La presencia en el suelo de aceptores de e⁻ que se utilizan a Eh altos inhibe la respiración con aceptores de e⁻ a menores Eh. Una elevada concentración de un determinado aceptor de e⁻ tampona el Eh del suelo. Por ejemplo,

elevadas concentraciones de NO_3^- en la solución del suelo pueden mantener el Eh $\approx +200$ mV (a pH = 7), incluso aunque la materia orgánica fresca pueda implicar un alto poder reductor (Cresser *et al.*, 1993), impidiendo por tanto la reducción del Mn^{4+} y Fe^{3+} y demás eslabones de la secuencia de reacciones en los suelos anaerobios, como se ha citado anteriormente en este mismo apartado. Igualmente, la presencia de elevadas concentraciones de SO_4^{2-} pueden inhibir la formación de CH_4 .

1.4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA VEGETACIÓN DE LOS HUMEDALES

Cronk y Fennessy (2001) definen las plantas de los humedales como aquellas especies que generalmente se encuentran creciendo sobre el H_2O o donde los suelos están inundados o saturados durante el tiempo suficiente para que las condiciones anaeróbicas se desarrollen en la zona de la raíz y que han evolucionado a adaptaciones especializadas en un ambiente anaeróbico. La clasificación de las plantas de los humedales establece los siguientes grupos:

- Plantas sumergidas: el ciclo de vida de estas especies ocurre bajo la superficie acuática, por lo que sus tejidos fotosintéticos se encuentran normalmente bajo el H_2O . Pueden estar enraizadas en el sustrato o flotar libremente en la columna de H_2O . Ejemplos: *Ceratophyllum*, *Elodea*, *Myriophyllum*, *Utricularia*.
- Plantas flotantes: las hojas y tallos de estas especies flotan sobre la superficie acuática. Si presentan raíces, éstas están libres en el H_2O . Ejemplos: *Lemna*, *Pistia*, *Spirodela*, *Wolffia*.
- Plantas con hojas flotantes: las hojas de estas especies flotan sobre la superficie del H_2O , pero sus raíces están ancladas al sustrato. Algunas especies adicionalmente generan hojas sumergidas (*Ranunculus flabellaris*) o emergentes (*Nymphaea alba*)
- Plantas emergentes: las raíces de estas especies están ancladas en el suelo, mientras que sus tallos, hojas (órganos fotosintéticos) y órganos reproductivos son aéreos. Ejemplos: *Phragmites*, *Polygonum*, *Juncus*, *Rhizophora*, *Spartina*, *Typha*.

La capacidad de supervivencia de las plantas de los humedales bajo condiciones de O_2 deficitario de suelos, en gran parte saturados, depende de la tasa de respiración de la planta y de la tasa de O_2 suministrado desde el tejido fotosintético a las raíces (Reddy y DeLaune, 2008). Las plantas de los humedales pueden sobrevivir con niveles de O_2 reducidos a través de adaptaciones fisiológicas (tal como la respiración anaeróbica radicular) y de adaptaciones morfológicas/anatómicas (tal como raíces adventicias y desarrollo de tejidos con espacios intercelulares llenos de aire o aerénquima).

1.4.1. ADAPTACIONES MORFOLÓGICAS AL MEDIO ACUÁTICO Y A NIVELES ALTOS DE SALINIDAD

Las plantas han desarrollado diversas adaptaciones para sobrevivir en medios saturados en H_2O y/o salinos.

La adaptación más importante de la vegetación a las condiciones anóxicas del suelo es el desarrollo del aerénquima. Se trata de un tejido altamente poroso, con espacios largos e interconectados (Jackson y Armstrong, 1999; Koppitz, 2004), lo que permite un intercambio de gases entre las partes aéreas y el órgano subterráneo, suministrando O_2 desde las hojas al extremo de la raíz, que es la zona activa donde se produce la respiración aerobia y la elongación, y enviando CO_2 y otros gases de la respiración radicular en sentido inverso (Kirk, 2004). Este tejido supone además un soporte estructural para la raíz y facilita la difusión del O_2 a los órganos carentes de él como consecuencia de la anaerobiosis (Tiner, 1999). El desarrollo de aerénquima también facilita el movimiento de gases desde la planta a la atmósfera, siendo un proceso importante para la detoxificación y eliminación de gases como CH_4 y etileno (C_2H_4) que se acumulan en cantidades tóxicas bajo condiciones de estrés por inundación (Colmer, 2003). No obstante, debe tenerse en cuenta que no todas las especies de humedales desarrollan aerénquima (Smirnoff y Crawford, 1983), estando más desarrollado en las especies monocotiledóneas (como las gramíneas) que en las dicotiledóneas (Reboreda y Caçador, 2007). El O_2 provisto por el aerénquima es

generalmente consumido en la respiración de la raíz o difundido a la rizosfera a través del proceso de pérdida radial de oxígeno (ROL) (Reddy y DeLaune, 2008), creando una capa oxidante de suelo alrededor de la zona activa de las raíces de las plantas de los humedales (Figura 1.1). El ROL es un importante mecanismo de defensa contra elementos reducidos potencialmente tóxicos como es el caso de los cationes Mn^{2+} y Fe^{2+} y el anión sulfuro (S^{2-}). Tales formas reducidas solubles se oxidan en la zona de influencia de la ROL (Jackson y Armstrong, 1999; Tiner, 1999) y de este modo se inmovilizan en la rizosfera. Aun así, los exudados orgánicos producidos en la rizosfera pueden estimular la actividad de microorganismos y, por lo tanto, favorecer condiciones anaeróbicas (Otero y Macías, 2002). Igualmente, la ROL inhibe el proceso de metanogénesis al promover la oxidación del CH_4 y reducir el flujo potencial de éste hacia la atmósfera (Li *et al.*, 2006).

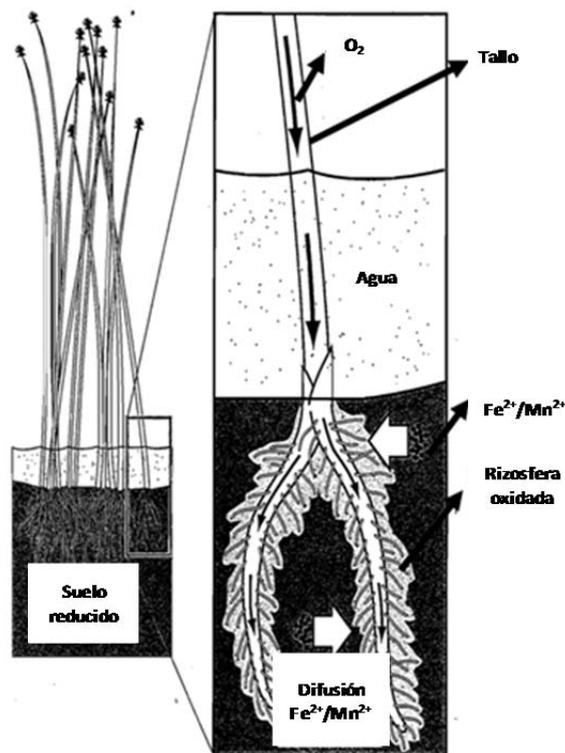


Figura 1.1. Formación de rizosferas oxidadas alrededor de las raíces de una planta de humedal debido al transporte del exceso de oxígeno (O_2) hacia el suelo que rodea las raíces. Fe^{2+}/Mn^{2+} : ión ferroso/ión manganoso (formas reducidas) (modificado de Mitsch y Gosselink, 2000).

Muchas de las plantas de los humedales son halófilas (plantas adaptadas a niveles altos de salinidad). Las adaptaciones de los halófitos tienen como finalidad última

permitir la absorción de H₂O en suelos con elevado potencial de succión (a causa de la reducida tensión osmótica provocada por las sales) y reducir la pérdida de ésta por transpiración, así como evitar la toxicidad causada por el exceso de sales. Algunas de las adaptaciones consisten en: cambios en la morfología de la hoja para minimizar la evapotranspiración; cambios en la resistencia estomática y cuticular; cambios en la elasticidad de los tejidos; glándulas secretoras de sal; ajuste osmótico involucrando iones inorgánicos, carbohidratos, y ácidos orgánicos; compartimentación de metabolitos en vacuolas celulares y anulación de iones tóxicos y desequilibrio de nutrientes (Jones y Corlett, 1992; Tiner, 1999; Cronk y Fennessy, 2001; Touchette *et al.*, 2007; Flowers y Colmer, 2008; Munns y Tester, 2008).

Las halófilas pueden clasificarse de diversas formas (Waisel, 1972):

- Por su comportamiento frente a las sales del suelo (Ashraf *et al.*, 2006; Weber, 2008):
 - Excluyentes o excretoras: son capaces de excretar el exceso de sales. Ejemplos: *Atriplex*, *Limonium*.
 - Incluyentes o suculentas: son capaces de almacenar gran cantidad de H₂O dentro de su organismo para minimizar la toxicidad por sales. Ejemplos: *Arthrocnemum*, *Sarcocornia*, *Salicornia*.
- Por la demanda de sal (Sabovlijevic y Sabovlijevic, 2007):
 - Obligadas: necesitan algo de sal para su adecuado desarrollo. Ejemplos: *Arthrocnemum*, *Halimione*, *Sarcocornia*.
 - Facultativas: pueden crecer bajo condiciones de estrés salino, pero también pueden crecer sin presencia de sal o al menos en un entorno donde la concentración de sal en el suelo es baja. Ejemplos: *Frankenia*, *Mesembryanthemum*, *Salsola*.

- Por el hábitat (Youssef, 2009):
 - Hidro–halófilas: pueden crecer en un suelo hídrico o en condiciones húmedas. Ejemplos: *Juncus*, *Phragmites*, *Scirpus*.
 - Xero–halófilas: crecen en suelos donde el contenido de H₂O es bajo. Ejemplos: *Atriplex*, *Frankenia*, *Suaeda*.

La distribución de las plantas en los humedales depende del régimen de inundación, de las propiedades de los suelos del humedal (como pH, materia orgánica, textura, y salinidad), el contenido de O₂ (representado por el Eh) y la capacidad de aireación de las raíces (Reddy y DeLaune, 2008).

1.4.2. *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud

Comúnmente conocido como carrizo, posee una distribución subcosmopolita, es decir, distribuida por casi todas las regiones del mundo. Suele aparecer en formaciones densas monoespecíficas o casi monoespecíficas llamadas carrizales, que están asociados a cursos de H₂O, tolerando un amplio rango de salinidad, humedad y condiciones redox (González-Alcaraz *et al.*, 2012, 2014). Su presencia se ve favorecida en zonas eutrofizadas (Carreño *et al.*, 2008), llegando a constituir un problema a nivel global debido a su elevada capacidad de colonizar los hábitats de otras especies, disminuyendo así la biodiversidad (Chambers *et al.*, 1999; Martínez-López *et al.*, 2014). Sin embargo, al mismo tiempo, esta especie se considera de gran interés por su capacidad para reducir la carga de nutrientes de aguas eutrofizadas (Ruiz y Velasco, 2010) y por su contribución al secuestro de C en su biomasa, su hojarasca y sus suelos.

Tabla 1.1. Clasificación de la especie *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.

REINO	<i>Plantae</i>
DIVISIÓN	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Liliopsida</i>
ORDEN	<i>Cyperales</i>
FAMILIA	<i>Poaceae</i>
GÉNERO	<i>Phragmites</i>

Phragmites (Tabla 1.1) es una planta herbácea, perenne, erecta, muy robusta y de crecimiento acelerado, que puede alcanzar > 3 m de altura. En su zona radicular se desarrollan rizomas leñosos, escamosos y nudosos. El tallo aéreo es generalmente simple y está formado por la sucesión de nudos y entrenudos que están cubiertos por las vainas de las hojas. Las hojas son enteras, largas (20–70 cm), estrechas (1–5 cm), agudas y de color verde grisáceo durante la época de desarrollo vegetativo.

La principal adaptación a los suelos anegados es la presencia de aerénquima (Jackson y Armstrong, 1999). En *Phragmites*, además del transporte presurizado gaseoso desde los vástagos a las raíces, la tasa de flujo gaseoso es realizada por la convección Venturi producida por el viento que succiona el aire hacia dentro del sistema subterráneo vía los tallos muertos cortados cerca del nivel del suelo. Por consiguiente el viento puede favorecer considerablemente la aireación de la rizosfera en el carrizo. Por otra parte, el crecimiento de raíces dentro de los agregados del suelo ayuda a descomponer la materia orgánica e impide la obstrucción del suelo mediante la creación de canales por lo que fluye el H₂O.

1.5. CICLOS Y TRANSFORMACIONES DE LOS NUTRIENTES EN LOS HUMEDALES

Debido a las condiciones de hidromorfía típicas de los humedales, los ciclos de nutrientes y las transformaciones de compuestos en estos ambientes tienen ciertas peculiaridades con respecto a las que se producen en suelos óxicos.

1.5.1. CICLO DEL NITRÓGENO (N) EN HUMEDALES

Los elementos de la familia del N muestran cuatro estados de oxidación principales, -3, 0, +3 y +5, aunque también se presentan otros como el +1, +2 o +4. Junto con el C, H, oxígeno (O), azufre (S) y P, el N es uno de los principales elementos presentes en los organismos. Lo hace en su forma más reducida, como NH_4^+ , formando parte de todas las proteínas, así como también de muchos otros materiales orgánicos.

El N es uno de los elementos limitantes para los seres vivos. Esto se debe a que la mayoría de los organismos no puede utilizar el N en su forma elemental, es decir como gas dinitrógeno (N_2). Para que las plantas puedan sintetizar proteínas tienen que obtener el N en forma de diversos compuestos. La forma más comúnmente utilizada es la del ion NO_3^- . Sin embargo, otras formas tales como el amonio (NH_4^+) son utilizadas por las plantas tanto en los sistemas naturales como en los agrícolas donde se añaden como fertilizantes (Sprent, 1987; Wild, 1989). En los ecosistemas acuáticos, el N se puede encontrar en dos formas, una soluble que es captada directamente por los organismos y puede contribuir significativamente a los procesos de eutrofización, y otra particulada que no tiene efecto directo importante sobre ésta. La forma soluble puede ser a su vez N disuelto inorgánico (NDI), que se corresponde con el NO_3^- , nitrito (NO_2^-) o NH_4^+ , o bien N disuelto orgánico (NDO), que forma parte de aminoácidos, proteínas y urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$). El NO_2^- es poco estable y sufre rápidamente una oxidación a NO_3^- , por lo que en la mayor parte de las aguas sus contenidos son muy escasos. Es de destacar la importancia del NDO, en cuya composición aparecen aminoácidos, aminoazúcares y $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ que son fácilmente mineralizables por lo que pueden tener un significado ecológico alto. No obstante, la mayoría del NDO está formado por moléculas de alto peso molecular como proteínas y polifenoles, que son resistentes al ataque microbiano y, consecuentemente, poseen una menor importancia en la contribución a los procesos de eutrofización (Jones *et al.*, 2004; Christou *et al.*, 2005). El N particulado es el que se encuentra formando parte de los restos orgánicos no disueltos y que apenas tiene significado en la eutrofización (Jones *et al.*, 2004; Christou *et al.*, 2005).

En los suelos el N sufre una serie de transformaciones que dependen de los procesos redox, pH y de la actividad microbiana y vegetal (Sprenst, 1987; Vepraskas y Faulkner, 2001). Las principales transformaciones del N que ocurren en los suelos son siete: 1) la fijación del N_2 , 2) la mineralización o amonificación del N de la materia orgánica para formar NH_4^+ , 3) la nitrificación del NH_4^+ formado, 4) la desnitrificación del NO_3^- para dar óxido nitroso (N_2O) y N_2 , 5) la reducción desasimilatoria del NO_3^- para dar NH_4^+ (DNRA), 6) la volatilización del gas amoníaco (NH_3) al formarse NH_4^+ , y 7) la absorción por los organismos (Figura 1.2).

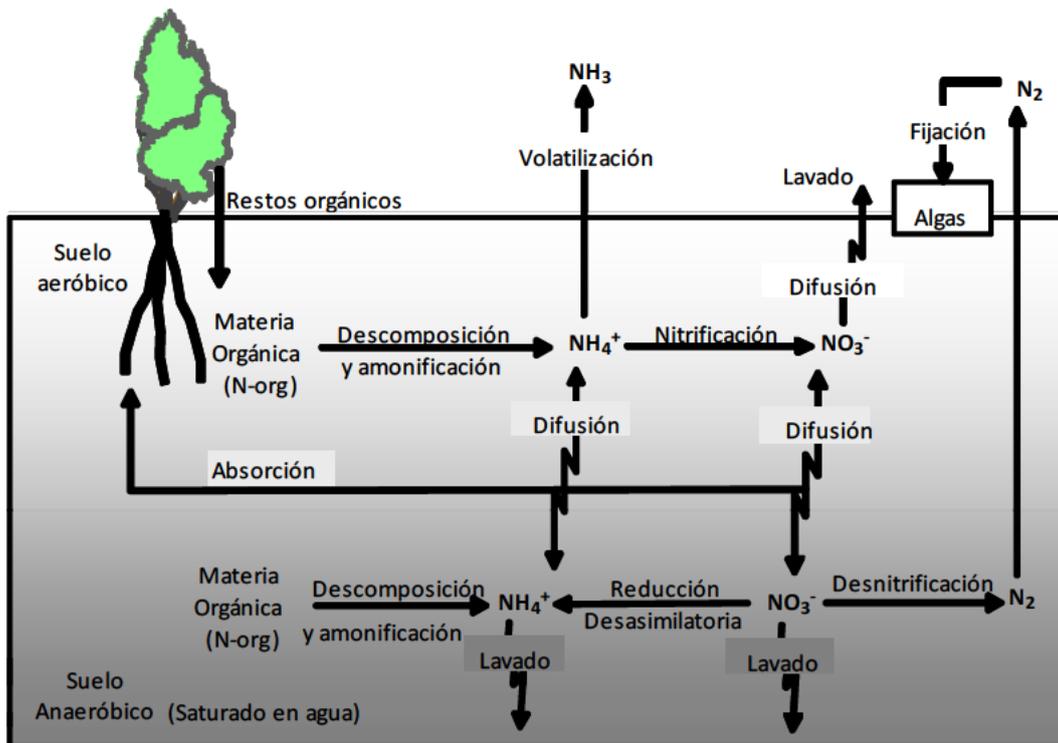
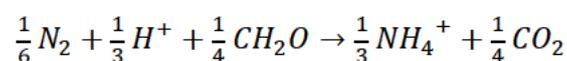


Figura 1.2. Esquema del ciclo del nitrógeno (N) en el suelo de un humedal (modificado de Vepraskas y Faulkner, 2001). N-org: N orgánico. NH_3 : amoníaco. N_2 : dinitrógeno. NO_3^- : nitrato. NH_4^+ : amonio.

1. La fijación atmosférica del N_2 probablemente representa $< 5\%$ del N que entra a un humedal (Vepraskas y Faulkner, 2001). Estos autores estiman que se puede fijar de $\approx 0,02$ a $90 \text{ g de N m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ en un humedal. La reacción de fijación de N_2 es la siguiente, donde el CH_2O (formaldehído) representa la materia orgánica:

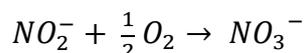
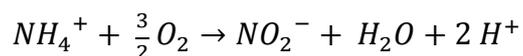


(Kirk, 2004) [Ecuación 1.7]

En los sistemas naturales, la fijación del N_2 se realiza biológicamente mediante algunas bacterias y algas que poseen un complejo enzimático llamado nitrogenasa, que les permite asimilar el N_2 como NH_3 con un alto consumo de trifosfato de adenosina (ATP). Las bacterias fijadoras del N_2 viven libremente en el suelo o asociadas a la rizosfera de algunas plantas, principalmente leguminosas (por ejemplo, las bacterias *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*).

2. Amonificación. La mineralización del N de la materia orgánica se produce en dos pasos. El primero es la amonificación, que consiste en la formación de NH_4^+ . Puede ser un proceso aerobio o anaerobio, aunque en presencia de O_2 se produce más rápidamente. Y el segundo es la nitrificación.

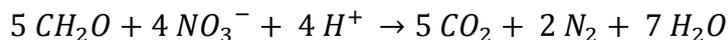
3. Nitrificación. Es el proceso mediante el cual se produce la transformación del NH_4^+ en NO_3^- por la acción de bacterias aerobias nitrificantes autótrofas y heterótrofas (Madigan *et al.*, 1997). Se ha estimado que entre un 0,01 a 0,16 g del $N-NO_3^- m^{-2} día^{-1}$ se produce por este proceso en humedales (Vepraskas y Faulkner, 2001). En una etapa inicial, el NH_4^+ se oxida a NO_2^- por la acción de bacterias quimiolitotrofas (*Nitrosomonas* y similares), y después el NO_2^- a NO_3^- por la acción de *Nitrobacter* y similares:



[Ecuación 1.8]

4. La desnitrificación es la vía principal por la que el N pasa a la atmósfera desde el suelo. Se define como la reducción microbiológica de NO_3^- y/o NO_2^- a N_2 , bien sea N_2 o N_2O (Madigan *et al.*, 1997). Con respecto a la incidencia sobre el medio ambiente por parte del N_2O , es un importante gas de efecto invernadero (GEI) con una permanencia media de 100 años en la atmósfera. Actualmente se le atribuye el 5 % del efecto invernadero, además de atacar la capa de ozono (O_3) al reducir el O_3 a O_2 , liberando dos moléculas de monóxido de nitrógeno (NO). En suelos hidromorfos se ha estimado un rango de producción de entre un 0,003 a 1,02 g de $N m^{-2} día^{-1}$ (Vepraskas y

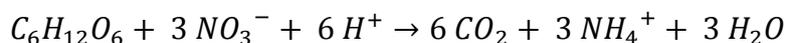
Faulkner, 2001). Es un proceso de respiración anaerobia que utiliza el NO_3^- como aceptor final de e^- en la cadena respiratoria según la siguiente reacción, donde el CH_2O representa la materia orgánica.



(Kirk, 2004) [Ecuación 1.9]

Las bacterias responsables de la desnitrificación son anaerobias facultativas que utilizan para su metabolismo el O_2 del aire, pero que pueden usar también NO_3^- como aceptor de e^- cuando la presencia de O_2 es limitada. Están involucrados organismos heterótrofos como los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* (Madigan *et al.*, 1997). Las condiciones más adecuadas para que se de la desnitrificación son una temperatura de 25 °C o superior, pH entre 6 y 8, elevada saturación del suelo en H_2O y existencia de compuestos orgánicos. Se ha comprobado que las mayores tasas de desnitrificación se dan en microambientes anaerobios de los primeros 10 cm del suelo ya que es ahí donde existe mayor contenido de materia orgánica (Vepraskas y Faulkner, 2001).

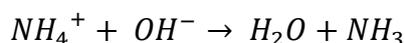
5. Reducción desasimilatoria del NO_3^- a NH_4^+ (DNRA). Rückauf *et al.* (2004) y Hongbo y Aelion (2005) señalan que solamente en condiciones de fuerte anaerobiosis y con bajas concentraciones de NO_3^- y altas de C, la reducción del NO_3^- para formar NH_4^+ puede contribuir significativamente a la eliminación del NO_3^- del medio, aunque conserva el N en el sistema. La reacción es la siguiente (Reddy y DeLaune, 2008), donde la glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) representa la materia orgánica:



[Ecuación 1.10]

6. La volatilización del NH_4^+ en forma de NH_3 se produce en suelos encharcados a pH elevado donde la cantidad de NH_3 llega a ser alta en relación a la de NH_4^+ , desprendiéndose el primero como gas (Sprent, 1987; Kirk, 2004). Este proceso suele ocurrir cuando la solución del suelo está saturada en cationes que compiten con el NH_4^+ por las posiciones de cambio evitando que éste se fije, por lo que puede

transformarse y volatilizarse como NH_3 (Holmboe y Kristensen, 2002). La reacción es la siguiente (Reddy y DeLaune, 2008):



[Ecuación 1.11]

7. Tras la amonificación y la nitrificación, que generan en el suelo un aumento del N inorgánico, se puede producir la inmovilización o captación asimilatoria de estas formas inorgánicas por parte de los organismos, para su posterior transformación en N orgánico.

1.5.2. CICLO DEL FÓSFORO (P) EN HUMEDALES

El P presenta unos estados de oxidación de -3 (PH_3), +3 (ácido fosforoso, H_3PO_3 , y derivados, óxido de fósforo (III), P_2O_3) y +5 (ácido fosfórico, H_3PO_4 , y derivados, óxido de fósforo (V), P_2O_5). El estado más abundante en la naturaleza es el +5, cuya máxima representatividad está en los orto-fosfatos. El fosfato existe como anión en forma de dihidrogenofosfato ($H_2PO_4^-$) a pH de entre 2 y 7, como hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) a pH ≈ 8 , o como fosfato (PO_4^{3-}) a pH de entre 12 y 14 (Vepraskas y Faulkner, 2001).

Los procesos biogeoquímicos relacionados con el P hacen que este elemento se encuentre muy poco disponible en los ecosistemas naturales, por lo que puede ser un factor limitante para el crecimiento de los organismos (Rubio *et al.*, 1995), ya que el papel que desempeña en la vida es absolutamente indispensable. Los ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas y muchas sustancias intermedias en la fotosíntesis y en la respiración celular contienen P.

Aportes de P exógeno, como el contenido en las aguas residuales municipales, industriales y agrícolas, pueden ocasionar fenómenos de eutrofización en los sistemas acuáticos. Las aguas municipales presentan una fuerte carga de detergentes fosforados, y sobre el 46 % de este P puede ser atribuido a detergentes (Gunatilaka *et al.*, 1988).

En el H₂O, las formas solubles de P reflejan directamente el estado trófico del sistema (Bloesch *et al.*, 1988). Estas formas se encuentran principalmente como fosfato inorgánico, pero pueden existir formas de P orgánico disuelto (fosfolípidos, ácidos nucleicos, fosfatos de inositol, fosfoazúcares) (Wild, 1989) que pueden suponer una gran parte del P total presente en el sistema, a veces superando en cantidad al fosfato inorgánico (Marion y Brient, 1998; Salvia-Castellví *et al.*, 2005; Tanner *et al.*, 2005).

Con respecto a las formas particuladas de P en el H₂O, éstas no siempre reflejan el estado trófico del sistema. Bloesch *et al.* (1988) establecen dos tipos de formas particuladas: una inorgánica, formada por partículas en suspensión de naturaleza mineral, y otra orgánica, procedente de restos orgánicos vegetales y animales que entran al sistema o es producida por los procesos biológicos y químicos que ocurren en el mismo.

La relativa inmovilidad del P en los ecosistemas está relacionada con diferentes procesos biogeoquímicos (Figura 1.3) que, en última instancia, van a provocar su retención en los suelos y/o sedimentos. Dentro del sistema suelo-agua-planta en humedales, se ha estimado que entre un 80–90 % del P presente se encuentra fijado en el suelo y el resto se distribuye entre las plantas y el H₂O (Vepraskas y Faulkner, 2001).

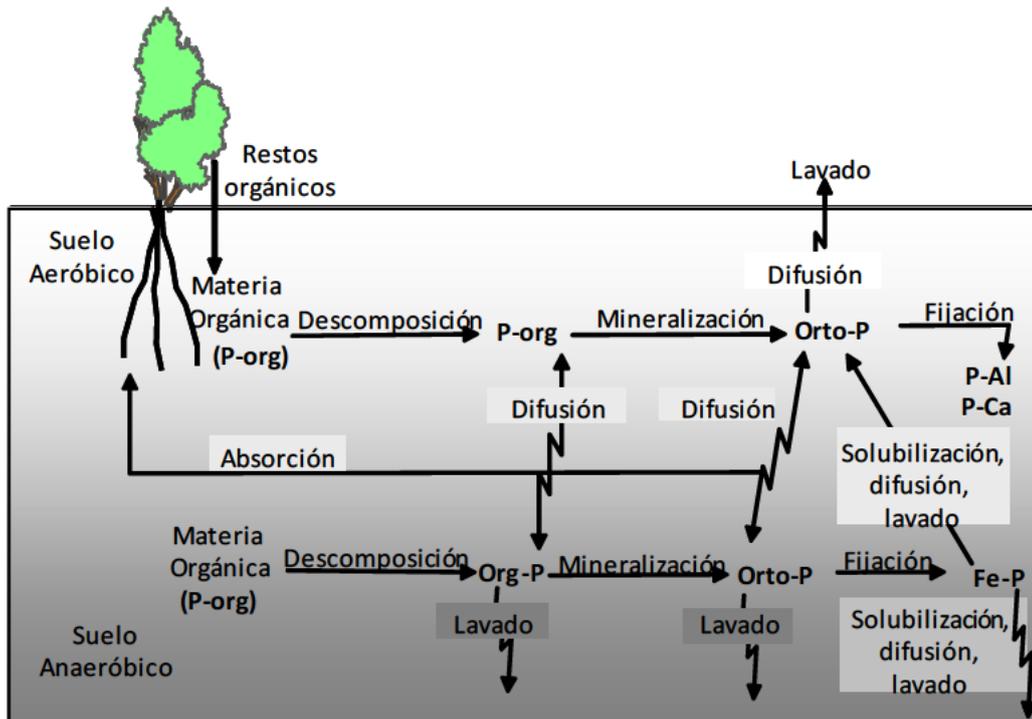


Figura 1.3. Esquema del ciclo del fósforo (P) en el suelo de un humedal (modificado de Vepraskas y Faulkner, 2001). P-org: fósforo orgánico; Orto-P: orto-fosfato. P-Al: fósforo adsorbido a minerales de Al. P-Ca: fósforo asociado a compuestos de Ca. P-Fe: fósforo adsorbido minerales de Fe.

El P se puede retener mediante un proceso de etapas múltiples, en el que probablemente participan varios mecanismos que son muy difíciles de separar, así como otras reacciones poco conocidas (Bohn, 1993). Las principales vías de retención de P en los suelos son:

1. Adsorción iónica a partículas del suelo (arcillas, materia orgánica, complejos arcillo-húmicos) a través de puentes catiónicos.
2. Adsorción a las superficies de las arcillas y de los óxidos e hidróxidos metálicos mediante la formación de enlaces covalentes entre los grupos hidroxilo (Bohn, 1993; Kirk, 2004).
3. Precipitación como fosfatos de calcio (Ca) (apatitos) o co-precipitación con carbonatos en suelos básicos. A $\text{pH} > 7$, la mayor parte del P en solución se encuentra como HPO_4^{2-} y al unirse al Ca forma apatitos de muy baja solubilidad tales como el hidroxiapatito, fosfatos octocálcico y tricálcico (Lindsay y Moreno, 1960). Además,

puede existir una co-precipitación de los carbonatos con los fosfatos de Ca, mediante sustitución isomórfica en su estructura de carbonato por fosfato según propone Knox *et al.* (2006):



[Ecuación 1.12]

4. Precipitación como fosfatos de hierro (Fe) y aluminio (Al) en suelos ácidos.
5. Inmovilización por procesos biológicos (captación como nutriente). El fosfato es captado por las raíces de las plantas y por los microorganismos y entra a formar parte de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.

Existen métodos analíticos, los llamados procedimientos de fraccionamiento o extracciones secuenciales de P, que permiten extraer las diferentes formas de P del suelo y que pueden verse en el capítulo 4.

1.6. EUTROFIZACIÓN EN HUMEDALES

La eutrofización hace referencia a una situación que tiene lugar en los sistemas acuáticos (estanques, lagos, corrientes y humedales), cuando los nutrientes son tan abundantes que las algas y/o fitoplancton crecen de forma descontrolada. Cuando dichas algas mueren, la población microbiana residente descompone el material y agota el O₂ disponible durante el proceso de respiración. Esto mata finalmente a otras especies acuáticas, particularmente a los peces, que no pueden soportar condiciones de escasez de O₂. La eutrofización es un proceso natural que tiene lugar a medida que los lagos envejecen y se llenan de sedimentos, durante la formación de los deltas y cuando los ríos buscan nuevos cauces. Cuando la actividad humana acelera este proceso y lo desencadena en un H₂O limpia, suele hablarse de eutrofización cultural.

Los nutrientes responsables de los fenómenos de eutrofización suelen proceder de los fertilizantes agrícolas, o bien de la descarga de vertidos domésticos e industriales

en ríos y lagos. El P y el N son dos de los nutrientes más importantes que contribuyen a la eutrofización.

Diversos trabajos destacan a los humedales como sistemas altamente efectivos en la depuración de aguas con elevadas concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-} (Jiménez-Cárceles y Álvarez-Rogel, 2008; González-Alcaraz, 2012; González-Alcaraz *et al.*, 2013), por lo que se les ha denominado como filtros verdes.

1.7. EL PAPEL DE LOS HUMEDALES COMO FILTROS VERDES

Como se ha comentado anteriormente, los humedales pueden actuar como filtros verdes. Este papel está determinado, fundamentalmente, por los procesos biogeoquímicos asociados a los cambios en las condiciones redox (como son la desnitrificación y la solubilización/insolubilización de metales), así como por la fijación de sustancias a diversos componentes edáficos, su precipitación y co-precipitación con otros compuestos y su inmovilización en la biomasa vegetal (Knight *et al.*, 2000). Por tanto, los humedales pueden depurar aguas contaminadas y/o eutrofizadas antes de que viertan a los cauces principales o al mar, lo que proporciona evidentes beneficios sin que se requieran más inversiones que la adecuada conservación y manejo del propio ecosistema.

Es habitual la construcción de humedales artificiales, cuya característica principal es imitar el proceso de depuración de los sistemas naturales. Los humedales artificiales son sistemas de depuración constituidos por lagunas, tanques o canales poco profundos (normalmente de < 1 m) con plantas propias de zonas húmedas (macrófitos acuáticos) y en los que los procesos de descontaminación son ejecutados simultáneamente por componentes físicos, químicos y biológicos del sistema. Estos humedales también se pueden incluir como parte de proyectos de restauración de ecosistemas.

Los humedales artificiales se clasifican en dos tipologías según si la circulación del H₂O es de tipo subterránea o superficial:

- Humedales de flujo superficial, donde el H₂O está expuesta directamente a la atmósfera y no circula preferentemente a través del sustrato (Figura 1.4).
- Humedales de flujo subsuperficial, donde la circulación del H₂O es subterránea a través de un medio granular (con una profundidad de la lámina de H₂O de ≈0,6 m), estando ésta en contacto con los rizomas y raíces de los macrófitos (Figura 1.4). Estos humedales se clasifican a su vez según el sentido de circulación del H₂O en horizontales o verticales. Los humedales con flujo horizontal funcionan permanentemente inundados. Los humedales con flujo vertical se diseñan con funcionamiento intermitente, es decir, tienen fases de llenado, reacción y vertido.

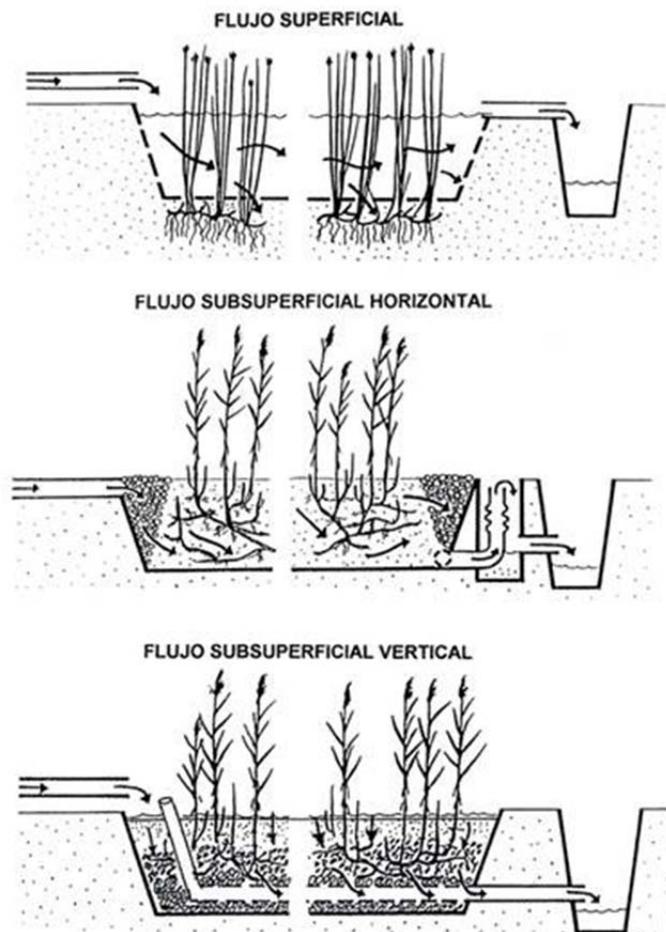


Figura 1.4. Esquema de funcionamiento de los humedales artificiales de flujo superficial y subsuperficial con flujo horizontal y con flujo vertical (García *et al.*, 2003).

Los humedales de flujo superficial se suelen utilizar como tratamiento adicional a efluentes previamente tratados en depuradoras de tipo convencional. Éstos suelen ser sistemas de gran tamaño con extensiones de varias e incluso hasta centenares de hectáreas. Además, en este tipo de proyectos, los objetivos de restauración y creación de nuevos ecosistemas tienen una gran importancia.

Los humedales de flujo subsuperficial son instalaciones de menor tamaño y que en la mayoría de los casos se utilizan como sistema de tratamiento de las aguas residuales generadas en casas, viviendas aisladas y núcleos de población de < 2000 habitantes.

En general, los humedales artificiales presentan claras ventajas con respecto a los sistemas de depuración convencionales mecanizados: su simplicidad de operación, un bajo o nulo consumo energético, una baja producción de residuos, un bajo impacto ambiental sonoro y una buena integración en el medio ambiente rural. Sin embargo, estos sistemas requieren de una superficie de tratamiento entre 20 y 80 veces superior a los sistemas convencionales de depuración (García *et al.*, 2003).

La capacidad depurativa de nutrientes y otras sustancias en los humedales depende en gran medida de los procesos físicos, químicos y microbiológicos que ocurren en sus suelos/sedimentos. Cuando un compuesto llega al suelo, en función de sus características, ocupa un lugar en alguna fase del sistema: sólida, líquida o gaseosa. La permanencia de una lámina de H₂O durante periodos prolongados de tiempo favorece las interacciones entre las fases sólida-líquida. De esta manera, se favorecen las posibilidades del suelo/sedimento de precipitar, neutralizar o retener las sustancias disueltas, a través de los procesos biogeoquímicos que en ellos se desarrollan.

1.8. EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO (GEI) EN HUMEDALES

Se denomina efecto invernadero al fenómeno por el que parte de la energía calorífica emitida por la corteza terrestre es retenida y reflejada por determinados gases que forman parte de la atmósfera, impidiendo que se produzca un enfriamiento progresivo de la Tierra. Sin la actuación de estos gases, la vida tal y como la conocemos

no sería posible, ya que el calor emitido por el planeta se disiparía en el espacio produciendo unas temperaturas extremadamente bajas en la Tierra (con un promedio de 33 °C menos que la temperatura actual). Estos gases reciben el nombre de GEI (IPCC, 2007). Sin embargo, desde la Revolución Industrial, las actividades humanas han aumentado considerablemente la cantidad de GEI presentes en la atmósfera, lo que ha intensificado el efecto invernadero natural provocando graves problemas en el clima.

Los humedales son fuentes emisoras de GEI, como el N_2O y el CO_2 , contribuyendo con el 40–55 % de las emisiones anuales globales (Boon y Lee, 1997; Christensen *et al.*, 2003; Bodelier y Laanbroek, 2004).

Por un lado, cuando los suelos están saturados, los procesos de respiración anaerobia de los microorganismos conllevan la emisión de N_2O , siendo escasa la emisión de CO_2 . Por el contrario, cuando los humedales se drenan, se estimula la respiración aerobia y como consecuencia se dan picos de emisión de CO_2 . Conocer el balance entre la cantidad de NO_3^- retirado de un H_2O eutrofizada y el N gaseoso (N_2O/N_2) emitido en los procesos de respiración anaerobia ayuda a valorar en qué medida los aspectos negativos de estos sistemas pueden verse o no compensados por los positivos.

1.8.1. ÓXIDO NITROSO (N_2O)

Gas traza de efecto invernadero que contribuye al calentamiento global y a la destrucción de la capa de O_3 en la atmósfera (Tallec *et al.*, 2008). Es incoloro, de olor ligeramente dulce y con un potencial para contribuir al calentamiento global en 100 años 310 veces superior al del CO_2 (Forster *et al.*, 2007). Casi el 60 % de las emisiones de N_2O a la atmósfera proceden de fuentes naturales y el resto de fuentes antropogénicas. En particular de los océanos, el suelo, la combustión de biomasa, el uso de fertilizantes, y diversos procesos industriales.

El N_2O se produce en humedales naturales y artificiales (Paredes *et al.*, 2007; Inamori *et al.*, 2008; Kampschareur *et al.*, 2009), como paso intermedio cuando el NO_3^-

es reducido a N_2 (Tao y Wang, 2009), a través de la desnitrificación (Tallec *et al.*, 2006). La humedad es un factor fundamental que influye en las emisiones de N_2O : cuando la desnitrificación se complete hasta su última etapa (sistemas completamente saturados) la mayoría del N_2O se transformará en N_2 y las emisiones serán menores que cuando no todo el N_2O se transforme en N_2 (sistemas no completamente saturados) (Butterbach-Bahl, 2013). Además, las bacterias responsables de la desnitrificación son sensibles a los cambios de humedad (Venterink *et al.*, 2002), lo que puede provocar que la desnitrificación no se complete, permaneciendo el N_2O (Groffman *et al.*, 2009). Todo esto dificulta la evaluación de las emisiones de N_2O en los humedales, ya que los cambios de humedad son una característica inherente a la mayoría de ellos, por lo que muchas veces se habla de emisiones potenciales de N_2O .

1.8.2. DIÓXIDO DE CARBONO (CO_2)

De entre los GEI, el CO_2 cobra especial relevancia por su efecto sobre las condiciones climáticas del planeta debido a su larga permanencia, es decir, es un gas que permanece activo en la atmósfera durante mucho tiempo. Así, por ejemplo, del CO_2 emitido a la atmósfera, sobre el 50 % tardará 30 años en desaparecer, un 30 % permanecerá varios siglos y el 20 % restante durará varios miles de años (Solomon *et al.*, 2007). Es un gas no tóxico, incoloro, denso y poco reactivo.

Las plantas tienen la capacidad de captar el CO_2 atmosférico y, mediante procesos fotosintéticos, metabolizarlo para la obtención de azúcares y otros compuestos que requieren para el normal desarrollo de su ciclo vital. Existen diversos factores que influyen en la cantidad de C acumulado tanto en la biomasa de las plantas como en el suelo. La tala de árboles y la quema de material vegetal que se aplican en los procesos de conversión de bosques a tierras agrícolas o ganaderas y, también, en la explotación maderera, liberan el C acumulado en las plantas y en el suelo, regresando éste a la atmósfera en forma de CO_2 . Las emisiones netas del sector agrícola y forestal se suman a las emisiones de CO_2 que se generan al quemar combustibles fósiles en los sectores de transporte y generación de energía.

1.9. EL CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA (CBM) COMO INDICADOR DE LA MICROBIOLOGÍA DEL SUELO

Un parámetro general que se utiliza para estimar la población microbiana del suelo es el C de la biomasa microbiana (CBM), que se define como la parte de la materia orgánica del suelo constituida por microorganismos vivos < 5–10 μm (Alef y Nannipieri, 1995). Se suele expresar en mg C kg^{-1} suelo seco o $\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo seco y generalmente constituye entre el 1 y el 5 % de la materia orgánica del suelo (Smith y Paul, 1990). Su interés radica en su función como fuente de nutrientes, formación y estabilización de la estructura del suelo e indicador ecológico.

1.10. BIBLIOGRAFÍA

Alef, K., Nannipieri, P. 1995. Microbial biomass. En: Alef, K. and P. Nannipieri. (Eds.), *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, Londres, Reino Unido. pp. 375-417.

Ashraf, M., Hameed, M., Arshad, M., Ashraf, Y., Akhtar, K. 2006. Salt tolerance of some potential forage grasses from Cholistan desert of Pakistan. En: Khan, M.A., Weber, D.J. (Eds.), *Ecophysiology of high salinity tolerant plants*. Springer, Holanda. pp. 31–54.

Baas Becking, I.G. M., Kaplan, I.R., Moore, D. 1960. Limits of the natural environment in terms of pH and oxidation–reduction potentials. *Journal of Geology*, 68: 243–284.

Bloesch, J., Bossard, P., Bühner, H., Bürgi, H.R., Uehlinger, U. 1988. Can results from limnocorral experiments be transferred to in situ conditions? (Biomanipulation in limnocorrals VI). *Hydrobiologia*, 159: 297–308.

Bodelier, P.L.E., Laanbroek, H.J. 2004. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *FEMS Microbial Ecology*, 47: 265–277.

- Bohn, L.H. 1993. Química del Suelo, Primera edición, Limusa, México DF, México. 356 pp.
- Boon, P.I., Lee, K. 1997. Methane oxidation in sediments of a floodplain wetland in south-eastern Australia. *Letters in Applied Microbiology*, 25: 138–142.
- Breeuwsma, A., Reijerink, J., Schoumans, O. 1995. Impact of manure on accumulation and leaching of phosphate in areas of intensive livestock farming. En: Steele, K. (Ed.), *Animal waste and the land–water interface*. Lewis Publishers CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. pp. 239–249.
- Butterbach-Bahl, K. 2013. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Science*, 368: 1–13.
- Carreño, M.F., Esteve, M.A., Martínez, J., Palazón, J.F., Pardo, M.T. 2008. Habitat changes in coastal wetlands associated to hydrological changes in the watershed. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 77: 475–483.
- Chambers, R.M., Meyerson, L.A., Saltonstall, K. 1999. Expansion of *Phragmites australis* into tidal wetlands of North America. *Aquatic Botany*, 64: 261–273.
- Christensen, T.R., Panikov, N., Mastepanov, M. Joabsson, A., Stewart, A., Oquist, M., Sommerkorn, M., Reynaud, S., Svensson, B. 2003. Biotic control on CO₂ and CH₄ exchange in wetlands a closed environment study. *Biogeochemistry*, 64: 337–354.
- Christou, M., Avramides, E.J., Roberts, J.P., Jones, D.L. 2005. Dissolved organic nitrogen in contrasting agricultural ecosystems. *Soil Biology and Biogeochemistry*, 37: 1560–1563.

- Colmer, T.D. 2003. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant Cell and Environment*, 26: 17–36.
- Craft, B.C. 2001. Biology of wetland soils. En: Richardson, J.L., Vepraskas, M.J. (Eds.), *Wetland Soils*. Lewis Publishers CRC Press, New York, EEUU. pp. 107–136.
- Cresser, M., Killham, K., Edwards, T. 1993. Soil Organic Matter. En: Cresser, M., Killham, K., Edwards, T. (Eds.), *Soil Chemistry and its Applications*. Cambridge Environmental Chemistry Series 5, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. pp. 28–57.
- Cronk, J.K., Fennessy, M.S. 2001. *Wetland plants: biology and ecology*. Lewis Publishers, Florida, EEUU. 440 pp.
- Dévai, I., Felföldy, L., Wittner, I., Plosz, S. 1988. Detection of phosphine: new aspects of the phosphorus cycle in the hydrosphere. *Nature*, 333: 343–345.
- Flowers, T.J., Colmer, T.D. 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179: 945–963.
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D.W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D.C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M., Van Dorland, R. Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. 2007. En: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. (Eds.), *Climate Change 2007: the physical science basis*. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. pp. 131–217.
- García, J., Vivar, J., Aromis, M., Mujeriego, R. 2003. *Water Research*, 37: 2645–2653.

- Gassmann, G., Glindemann, D. 1993. Phosphane (PH₃) in the biosphere. *Angewandte Chemie-International edition in English*, 32: 761–763.
- González-Alcaraz, M.N. 2012. Dynamics of nitrogen, phosphorus and metals in eutrophic wetlands affected by mine wastes. Effects of liming on plant growth and metals mobility. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena. Murcia, España. 231 pp.
- González-Alcaraz, M.N., Egea, C., Jiménez-Cárceles, F.J., Párraga, I., María-Cervantes, A., Delgado, M.J., Álvarez-Rogel, J. 2012. Storage of organic carbon, nitrogen and phosphorus in the soil–plant system of *Phragmites australis* stands from a eutrophicated Mediterranean salt marsh. *Geoderma*, 185–186: 61–72.
- González-Alcaraz, M.N., Conesa, H.M., Álvarez-Rogel, J. 2013. When liming and revegetation contribute to mobilize metals: learning lessons for phytomanagement of hydric mine soils. *Journal of Environmental Management*, 116: 72–80.
- González-Alcaraz, M.N., Jiménez-Cárceles, F.J., Álvarez, Y., Álvarez-Rogel, J. 2014. Gradients of soil salinity and moisture, and plant distribution, in a Mediterranean semiarid saline watershed: a model of soil–plant relationships for contributing to the management. *Catena*, 115: 150–158.
- González-Bernáldez, F. 1988. Typology of wetlands and evaluation of the resources they represent. En: International Symposium on Hydrology of Wetlands in Semiarid and Arid Regions. Sevilla, España.
- Groffman, P.M., Williams, C.O., Pouyat, R.V. 2009. Nitrate leaching and nitrous oxide flux in urban forests and grasslands. *Journal of Environmental Quality*, 38: 1848–60.

- Gunatilaka, A., Herodek, S., Istanovics, V., Dobolyi, E. 1988. Biological availability of sediment phosphorus. En: Sediment phosphorus group: working group summaries and proposals for future research. *Archives für hydrobiologie Beih. Ergebn. Limnologischem*, 30: 83–112.
- Holmboe, N., Kristensen, E. 2002. Ammonium adsorption in sediments of a tropical mangrove forest (Thailand) and a temperate Wadden Sea area (Denmark). *Wetlands Ecology and Management*, 10: 453–460.
- Hongbo, M.A., Aelion, C.M. 2005. Ammonium production during microbial nitrate removal in soil microcosm from a developing marsh estuary. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1869–1878.
- Inamori, R., Wang, Y., Yamamoto, T., Zhang, J., Kong, H., Xu, K., Inamori, Y. 2008. Seasonal effect on N₂O formation in nitrification in constructed wetlands. *Chemosphere*, 73: 1071–1077.
- IPCC, 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Génova, Suiza, 104 pp.
- Jackson, M.B., Armstrong, W. 1999. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biology*, 1: 274–287.
- Jiménez-Cárceles F.J., Álvarez-Rogel, J. 2008. Phosphorus fractionation and distribution in salt marsh soils affected by mine wastes and eutrophicated water: A case study in SE Spain. *Geoderma*, 144: 299–309.
- Jones, H.G., Corlett, J.E. 1992. Current topics in drought physiology. *Journal of Agricultural Science*, 119: 291–296.

- Jones, D.L., Shannon, D., Murphy, D.V., Farrar, J. 2004. Role of dissolved organic nitrogen (DON) in soil cycling in grassland soils. *Soil Biology and Biogeochemistry*, 36: 749–756.
- Kampschreur, M.J., Temmink, H., Kleerebezem, R., Jetten, M.S.M., van Loosdrecht, M.C.M. 2009. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research*, 43: 4093–4103.
- Kirk, G. 2004. The biogeochemistry of submerged soils. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, Reino Unido. 291 pp.
- Knight R.L., Payne, V.W.M., Borer, R.E., Clarke, Jr. R.A., Pries, J.H. 2000. Constructed wetlands for livestock wastewater management. *Ecological Engineering*, 15: 41–55.
- Knox, A.S., Kaplan, D.I., Paller, M.H. 2006. Phosphate sources and their suitability for remediation of contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 357: 271–279.
- Koopitz, H. 2004. Effects of flooding on the amino acid and carbohydrate patterns of *Phragmites australis*. *Limnologica*, 34: 37–47.
- Li, S., Pezeshki, S.R., Shields, F.D. 2006. Partial flooding enhances aeration in adventitious roots of black willow (*Salix nigra*) cuttings. *Journal of Plant Physiology*, 163: 619–628.
- Lindsay, W.L., Moreno, E.C. 1960. Phosphate phase equilibria in soils. *Soil Science Society of America Proceedings*, 24: 177–182.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1997. Brock Biología de los Microorganismos. Prentice Hall, Madrid, España. 986 pp.

- Marion, L., Brient, L. 1998. Wetland effects on water quality; input-output studies of suspended particulate matter, nitrogen (N) and phosphorus (P) in Grand-Lieu, a natural plain lake. *Hydrobiology* 373–374: 217–235.
- Martínez-López, J., Carreño, M.F., Palazón-Ferrando, J.A., Martínez-Fernández, J., Esteve, M.A. 2014. Remote sensing of plant communities as a tool for assessing the condition of semiarid Mediterranean saline wetlands in agricultural catchments. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 26: 193–204.
- Mausbach, M.J., Blake-Parker, W. 2001. Background and history of the concept of hydric soils. En: Richardson, J.L., Vepraskas, M.J. (Eds.), *Wetland soils. Genesis, hydrology, landscapes and classification*. Lewis Publishers, Florida, EEUU. pp 19–33.
- Mitsch, W.J., Gosselink, J.G. 1993. *Wetlands*, 2nd edition. John Wiley, New York, EEUU. 736 pp.
- Mitsch, W.J., Gosselink, J. E. 2000. *Wetlands*, 3rd edition. John Wiley & Sons, New York, EEUU. 920 pp.
- Munns, R., Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651–681.
- Otero, X.L., Macías, F. 2002. Variation in depth and season in metal sulfides in salt marsh soils. *Biogeochemistry*, 61: 247–268.
- Otero, X.L., Macías, F. 2003. Spatial variation in pyritization of trace metals in salt marsh soils. *Biogeochemistry*, 62: 59–86.

- Paredes, D., Kuschik, P., Mbwette, T.S.A., Stange, F., Müller, R.A., Köser, H. 2007. New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment. A review. *Engineering in Life Sciences*, 7, 13–25.
- Patrick, W.H. Jr., Gambrell, R.P., Faulkner, S.P. 1996. Redox measurements of soils. En: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*. Soil Science Society of America, Madison, EEUU. pp. 1255–1273.
- Ramsar Convention on Wetlands. 2001. Wetlands: values and functions. 30th Anniversary on the Ramsar Convention. Argentina.
- Reboreda R., Caçador, I. 2007. Cooper, zinc and lead speciation in salt marsh sediments colonized by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritime*. *Chemosphere*, 69: 1655–1661.
- Reddy, K.R., DeLaune, R.D. 2008. *Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications*, first ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. 773 pp.
- Richards, L.A. 1974. *Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos*. Editorial Limusa, México. 172 pp.
- Rubio, G., Lavado, R.S., Rendina, A., Bargiela, M. 1995. Waterlogging effects on organic phosphorus fractions in a toposequence of soils. *Wetlands* 15: 386–391.
- Ruiz, M., Velasco, J. 2010. Nutrient bioaccumulation in *Phragmites australis*: management tool for reduction of pollution in the Mar Menor. *Water, Air and Soil Pollution*, 205: 173–185.
- Rückauf, U., Agustin, J., Russow, R., Merbach, W. 2004. Nitrate removal from drained and reflooded fen soils affected by soil N transformation processes and plant uptake. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 77–90.

- Sabovlijevic, M., Sabovlijevic, A. 2007. Contribution to the coastal bryophytes of the Northern Mediterranean: Are there halophytes among bryophytes? *Phytologia Balcanica*, 13: 131–135.
- Salvia-Castellví, M., Iffly, J.F., Borghet, P.V., Hoffman, L. 2005. Dissolved and particulate nutrient export from rural catchments: A case study of Luxembourg. *Science of the Total Environment*, 344: 51–65.
- Smirnoff, N., Crawford, R.M.M. 1983. Variation in the structure and response to flooding of root aerenchyma in some wetland plants. *Annals of Botany*, 51: 237–249.
- Smith, J., Paul, E. 1990. The significance of soil microbial biomass estimations. *Soil Biology and Biochemistry*, 6: 357–396.
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Alley, R.B., Berntsen, T., Bindoff, N.L., Chen, Z., Chidthaisan, A., Gregory, J.M., Hegerl, G.C., Heimann, M., Hewitson, B., Hoskins, B.J., Joos, F., Jouzel, J., Kattsov, V., Lohmann, U., Matsuno, T., Molina, M., Nicholls, N., Overpeck, J., Raga, G., Ramaswamy, V., Ren, J., Rusticucci, M., Somerville, R., Stocker, T.F., Whetton, P., Wood, R.A., Wratt, D. 2007. Technical Summary. En: Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M., Marquis, K.B., Averyt, M., Tignor y H.L. Miller (Eds.), *Climate Change 2007: The Physical Science Bases. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido y New York, EEUU. 25 pp.
- Sparks, D.L. 2003. Redox Chemistry of Soils. En: Sparks, D.L. (Ed.), *Environmental Soil Chemistry*, 2nd ed. Academic Press, New York, EEUU. pp. 245–265.
- Sprent, J.I. 1987. *The ecology of the N cycle*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. 151 pp.

- Tallec, G.I., Garnier, J., Billen, G., Gossiaux, M. 2006. Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: Effect of oxygenation level. *Water Research*, 40: 2972–2980.
- Tallec, G.I., Garnier, J., Billen, G., Gossiaux, M. 2008. Nitrous oxide emissions from denitrifying activated sludge of urban wastewater treatment plants, under anoxia and low oxygenation. *Bioresource Technology*, 99: 2200–2209.
- Tanner, C.C., Nguyen, M.L., Sukias, J.P.S. 2005. Nutrient removal by a constructed wetland treating subsurface drainage from grazed dairy pasture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 15: 145–162.
- Tao, W., Wang, J. 2009. Effects of vegetation, limestone and aeration on nitrification, anammox and denitrification in wetland treatment systems. *Ecological Engineering*, 35: 836–842.
- Tiner, R.W. 1999. Plant indicators of wetlands and their characteristics. En: Tiner, R.W. (Ed.), *Wetland indicators: a guide to wetland identification, delineation, classification and mapping*. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. pp. 51–99.
- Touchette, B.W., Iannaccone, L.R., Turner, G.E., Frank, A.R. 2007. Drought tolerance versus drought avoidance: a comparison of plant–water relations in herbaceous wetland plants subjected to water withdrawal and repletion. *Wetlands*, 27: 656–667.
- Venterink, H.O., Davidsson, T.E., Kiehl, K., Leonardson, L. 2002. Impact of drying and rewetting on N, P and K dynamics in a wetland soil. *Plant and Soil*, 243(1): 119–130.

Vepraskas, M.J., Faulkner, S. 2001. Redox chemistry of hydric soils. En: Richardson, J.L., Vepraskas, M.J. (Eds.). *Wetlands soils. Genesis, hydrology, landscapes and classification*. Lewis Publishers, Florida, EEUU. pp. 85–105.

Waisel, Y. 1972. *Biology of Halophytes*, Academic Press, New York, EEUU. 30 pp.

Weber, D.J. 2008. Adaptive mechanisms of halophytes in desert regions. En: Ashraf M., Ozturk, M., Athar, H.R. (Eds.), *Salinity and water stress*. Springer–Verlag, Holanda. pp. 179–186.

Wild, A. 1989. *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell*. Ediciones Mundi–Prensa, Madrid, España. 1045 pp.

Youssef, A.M. 2009. Salt tolerance mechanisms in some halophytes from Saudi Arabia and Egypt. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5: 191–206.

CAPÍTULO 2

Área de estudio

2. ÁREA DE ESTUDIO

2.1. LA LAGUNA DEL MAR MENOR

La laguna del Mar Menor se ubica en la cuenca del Campo de Cartagena, situada en la costa Sureste de la Península Ibérica ($37^{\circ}38' - 37^{\circ}50' \text{ N}$, $0^{\circ}42' - 0^{\circ}52' \text{ W}$) (Figura 2.1), y baña los municipios de San Pedro del Pinatar, San Javier, Los Alcázares y Cartagena. Constituye la laguna costera más grande del Mar Mediterráneo y de la Península Ibérica, con una extensión de 135 km^2 , un perímetro de $59,5 \text{ km}$, una profundidad media de $3,6 \text{ m}$ y máxima de 6 m , y un volumen de agua de 580 hm^3 (Victoria-Jumilla, 1983; Conesa-García, 1990; Díaz del Río, 1993), y es la laguna salada más grande de Europa. Las características climatológicas del territorio (temperaturas medias anuales $\approx 17^{\circ} \text{ C}$; escasez de precipitaciones con una media de 275 mm año^{-1} ; alta insolación de 3000 h año^{-1} , siendo los días del año en los que el cielo está cubierto tan sólo de un 17% ; evapotranspiración media de 856 mm año^{-1}) y las propias características de la laguna (reducida comunicación con el Mar Mediterráneo y escasos aportes hídricos continentales) confieren al Mar Menor una alta salinidad ($42 - 47 \text{ g L}^{-1}$) y acusados contrastes térmicos entre invierno y verano. Por lo tanto, desde el punto de vista ambiental, el Mar Menor constituye uno de los ecosistemas más relevantes del Mar Mediterráneo.

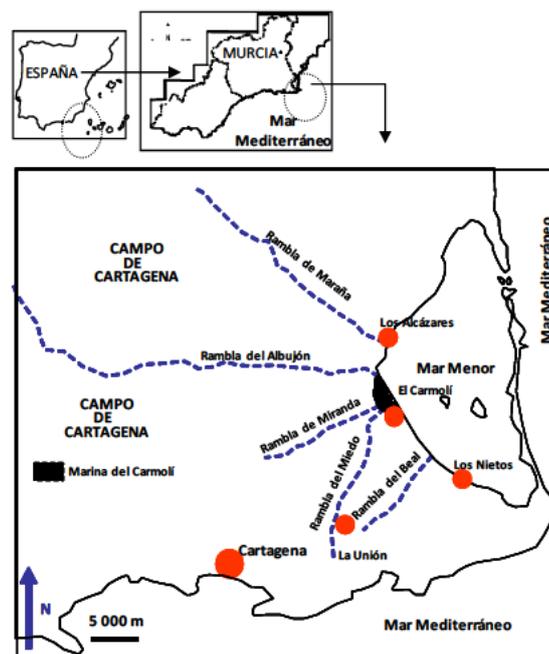


Figura 2.1. Mapa de localización de la laguna del Mar Menor en el Sureste de España.

El Mar Menor se encuentra separado del Mar Mediterráneo por una estrecha lengua de arena apoyada en contrafuertes rocosos de origen volcánico, denominada La Manga, de 22 km de longitud y un ancho de 0,1 a 1,2 km (Fotografía 2.1). La Manga ostenta 5 canales poco profundos, que actúan como sistemas de comunicación entre mares, llamados golas: la de Marchamalo, las encañizadas de La Torre, el Ventorrillo, El Charco y El Estacio (Díaz del Río, 1993). De estos canales, 4 de ellos tienen una profundidad < 1 m y uno de ellos, El Estacio, en 1973, para la construcción del puerto deportivo Tomás Maestre, fue ensanchado hasta los 30 m y dragado hasta los 5 m de profundidad para hacerlo navegable. En total, las entradas a la laguna suman una anchura de 645 m (Pérez-Ruzafa *et al.*, 2005) y el tiempo de residencia del agua es de 0,79 años (Pérez-Ruzafa *et al.*, 1991, 2002). Por lo tanto, la laguna del Mar Menor se clasifica como una laguna restringida (Pérez-Ruzafa *et al.*, 2005).



Fotografía 2.1. Imagen aérea de la laguna del Mar Menor (Fuente: www.cartagena.es).

Dentro de la laguna existen 5 islas o islotes de origen volcánico, formadas durante el Plioceno, y que constituyen 5 hitos paisajísticos de excepcional interés (CARM, 2005). Todas estas islas se sitúan de forma agrupada en la porción meridional de la laguna, muy próximas a La Manga del Mar Menor. En función de su tamaño se agrupan en:

- Islas mayores: Isla Mayor o del Barón, con una superficie de 93,8 ha, e Isla Perdiguera, con 25,8 ha, ambas en la parte central de la laguna aproximadamente.
- Islas menores: Isla del Ciervo con una superficie de 16,8 ha, Isla del Sujeto con 2,4 ha, e Isla Redonda, Rondella o Rondela, la más pequeña. Constituyen un importante centro de nidificación de aves.

El Mar Menor, junto con los humedales que lo bordean, constituye la principal zona húmeda de la Región de Murcia, con una superficie próxima a las 15000 ha (150 km²) (Díaz del Río, 1993; Vidal-Abarca *et al.*, 2003).

2.1.1. LEYES, NORMATIVAS Y FIGURAS DE PROTECCIÓN MEDIOAMBIENTAL

La laguna del Mar Menor y sus alrededores disponen de 12 figuras de protección medioambiental (Figura 2.2).

A nivel internacional, el Mar Menor está incluido en el convenio relativo a Humedales de Importancia Internacional (Convenio RAMSAR), con el código RAMSAR nº 706. En noviembre de 2001, en el XII Encuentro de las Partes del Convenio de Barcelona (convenio para la Protección del Mar Mediterráneo contra la Contaminación de 1975), el Mar Menor, así como la zona oriental mediterránea de la costa de la Región de Murcia, fue declarado Zona Especialmente Protegida de Interés para el Mediterráneo (ZEPIM) (Pérez-Ruzafa y Aragón, 2002).

A nivel nacional, el Mar Menor es un Espacio Protegido de la Red Natura 2000, desarrollada al amparo de la Directiva Hábitat 92/43/CEE de 21 de mayo de 1992, según la Ley 42/2007 de 13 de diciembre del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad. La laguna, y en especial sus salinas, son una zona estratégica para la nidificación, migración e invernada de muchas especies de aves acuáticas y marinas protegidas por la legislación española y europea (Directiva de Aves 79/409/CEE). Entre ellas destacan 4 especies nidificantes regulares: la avoceta (*Recurvirostra avosetta*), la cigüeñela (*Himantopus himantopus*), el chorlito patinegro (*Charadrius alexandrinus*) y el

charrancito (*Sterna albifrons*). Como consecuencia de la aprobación de la Ley 7/1995, de Protección de la Fauna Silvestre, y con un enfoque basado en la protección de especies de fauna singulares y amenazadas, el Mar Menor y los humedales asociados fueron declarados Área de Protección de la Fauna Silvestre (APF). En los humedales del Mar Menor, y en otros ecosistemas de su entorno, existen poblaciones de otras especies de fauna y flora, así como hábitats naturales, que gozan de la máxima protección en el ámbito europeo. Destacan el fartet (*Aphanius iberus*), pequeño pececillo incluido en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas, los saladares, las estepas salinas y diversos tipos de matorrales. Una de las últimas figuras legislativas adquiridas es la de financiación de Inversión Territorial Integrada (ITI), instrumento financiero avalado por la Unión Europea (UE), siendo el Mar Menor una de las 3 ITI'S autorizadas por la UE para el territorio español.

A nivel regional, la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM) declaró como Paisaje Protegido el espacio natural denominado Espacios Abiertos e Islas del Mar Menor (Ley 4/1992, de 30 de julio, de Protección y Ordenación del Territorio de la Región de Murcia), que cuenta con el Plan de Ordenación de los Recursos Naturales (PORN) aprobado inicialmente por Orden de 29 de diciembre de 1998 (BORM nº 15, de 20 de enero de 1999). Además, el Mar Menor cuenta con las figuras de Zona de Especial Protección para las Aves (ZEPA) (CARM, 2005) y Lugar de Importancia Comunitaria (LIC). La declaración de LIC fue el paso previo a su inclusión en la red europea Natura 2000 (CARM, 2005). Asimismo, la CARM elaboró en 2005 el PORN del espacio natural de los Espacios Abiertos e Islas del Mar Menor y Cabezo Gordo (CARM, 2005), cuya aprobación aún está pendiente.

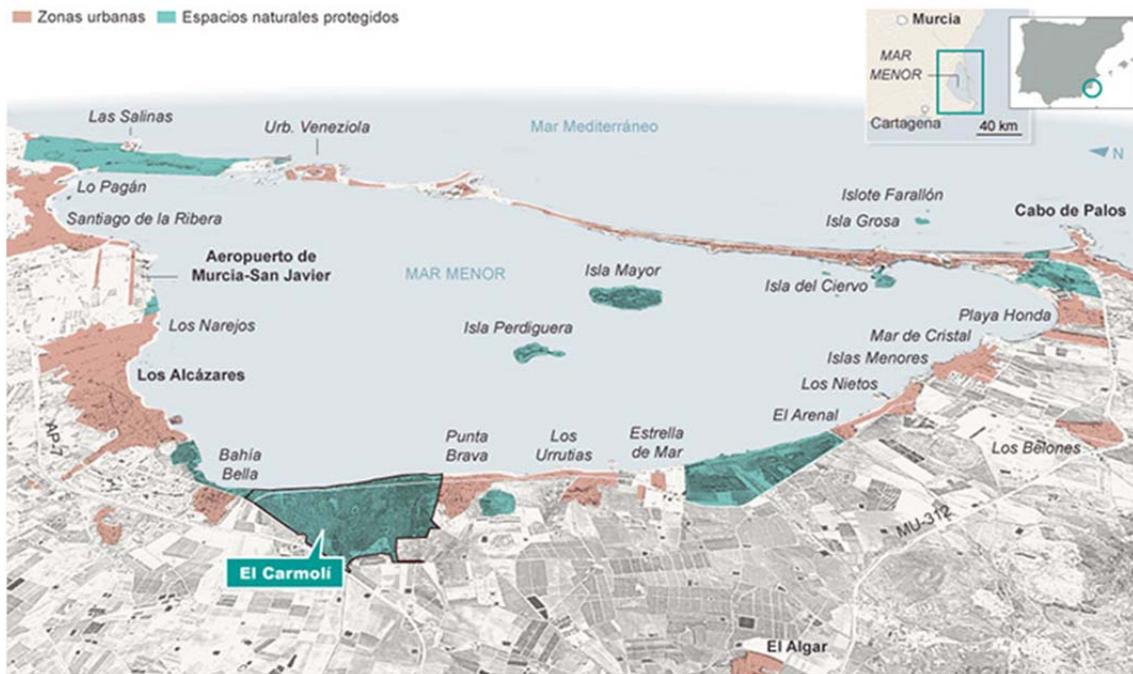


Figura 2.2: Espacios naturales protegidos en la laguna del Mar Menor y alrededores (Fuente: www.forocartagena.com).

En 2016, la Oficina de Impulso Socioeconómico del Medio Ambiente (OISMA), órgano directivo de la Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente de la CARM, empezó la tramitación de la declaración de Zonas de Especial Conservación (ZEC) y aprobación del Plan de Gestión Integral de los Espacios Protegidos del Mar Menor y la Franja Litoral Mediterránea de la Región de Murcia, en cumplimiento de la Ley 42/2007 de 13 de diciembre del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad. Asimismo, el OISMA debe de fijar las medidas de conservación necesarias que respondan a las exigencias ecológicas de los tipos de hábitats naturales y de las especies presentes en tales áreas (BORM nº 182, de 6 de agosto de 2016).

2.1.2. PRINCIPALES IMPACTOS SOBRE LA LAGUNA DEL MAR MENOR Y SU ENTORNO

La laguna del Mar Menor ha sufrido a lo largo de su historia reciente (desde los años 60 del siglo XX) un proceso de transformación debido a la intervención humana, que ha ido modificando sus características físicas y biológicas. Entre las actividades humanas de mayor impacto se encuentran los cambios en las prácticas agrícolas, el desarrollo urbanístico y la minería, que han ocasionado un aumento de la entrada de residuos a la laguna. Muchas de estas actividades han provocado cambios

medioambientales tales, que han afectado a la biota de la propia laguna, modificando su configuración (Pérez-Ruzafa *et al.*, 2005; Conesa y Jiménez-Cárceles, 2007) y contribuyendo, por ejemplo, a la proliferación de medusas. Otros impactos son la regeneración de playas y los dragados como el de la ampliación del canal del Estacio en 1973, que condujo a una progresiva mediterrización del Mar Menor, debido a la disminución de la salinidad y de la temperatura del agua de la laguna, favoreciendo la entrada de especies alóctonas.

2.1.2.1. IMPACTOS DE LAS ACTIVIDADES AGRÍCOLAS

Uno de los impactos más importantes en la laguna debido a la actividad humana ha sido el aumento de la sedimentación, que ha pasado de 3 a 30 cm siglo⁻¹, debido a la deforestación de las tierras circundantes durante los siglos XVI y XVII para uso agrícola y de pastoreo, con la consiguiente disminución del tamaño de la laguna. Así, el Mar Menor pasó de tener un área de 185 km² en 1868 a presentar en 1969 una extensión de 135 km². Además, y como consecuencia de la colmatación de la laguna, la profundidad también ha disminuido (Lillo-Carpio, 1978; Pérez-Ruzafa *et al.*, 1987).

La agricultura en el Campo de Cartagena se basó en sistemas extensivos de cultivos de secano hasta 1979, año en el que empezó a trasvasarse agua del río Tajo al río Segura a través del Acueducto Tajo–Segura. A partir de ese momento la agricultura en la zona experimentó un cambio hacia una explotación intensiva de regadío, con mayores necesidades de agua y de fertilizantes (Pérez-Ruzafa *et al.*, 2002). Este cambio provocó una subida del nivel freático, como consecuencia de la disminución en la sobreexplotación de las aguas subterráneas y de la adición de agua para el riego, lo que ha provocado, además, la contaminación del agua subterránea por nitratos (NO₃⁻). En estas condiciones los cursos de agua (llamados ramblas), que sólo permanecían inundados durante los periodos de fuertes lluvias, ahora lo estén de manera habitual, transportando hacia el Mar Menor y los humedales de su entorno los efluentes de las zonas agrícolas con elevada carga de agroquímicos y pesticidas (Tabla 2.1) (SACYR S.A., 1997, Martínez y Esteve, 2000, 2002; Pérez-Ruzafa *et al.*, 2000, 2002; Pérez-Ruzafa y Aragón, 2002; Ruíz-Martínez, 2006; Jiménez-Cárceles *et al.*, 2006, Jiménez-Cárceles y

Álvarez-Rogel, 2008; García-Pintado, *et al.*, 2009; Fenoll y Sáez, 2009; Moreno-González, 2015).

El cauce principal por el que se producen las entradas de agroquímicos a la laguna es la Rambla del Albujión. Este cauce, además de recibir drenajes y excedentes de las áreas de cultivo, recibe el agua de tuberías que recogen los efluentes de salmuera procedentes de las explotaciones agrícolas (Fotografía 2.2). El origen de estas salmueras está en que los agricultores extraen el agua subterránea y para hacerla apta para el regadío la filtran a través de desalobradoras que eliminan el exceso de NO_3^- y otras sales. Los efluentes de las desalobradoras son conducidos a través de tuberías subterráneas a colectores que vierten a la Rambla del Albujión y de ahí a la laguna. Algunos trabajos recientes han citado, además, la entrada de elevadas cantidades de agua cargada en NO_3^- directamente a la laguna a través de los acuíferos (Jiménez-Martínez *et al.*, 2016).



Fotografía 2.2. Tuberías que vierten salmueras en la Rambla del Albujión (Fuente: www.laverdad.es).

Los vertidos de NO_3^- provocaron que en diciembre del 2002 el Campo de Cartagena fuera declarado zona vulnerable a la contaminación producida por nitratos utilizados en agricultura (ZVN), según la Directiva 91/676/CEE de 12 de diciembre de

1991, sobre la protección de aguas frente a la contaminación por nitratos derivada de fuentes agrícolas por su incidencia sobre las aguas subterráneas. A pesar de esto, Moreno-González *et al.* (2013) señalaron que cada año se vierten al Mar Menor más de 27 kg de pesticidas y fármacos, entre los que se han detectado 70 contaminantes de distinta naturaleza.

Tabla 2.1. Concentraciones de nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y fosfato (PO_4^{3-}) (mg L^{-1}) en algunos cursos de agua (ramblas) que desembocan en el Mar Menor (modificado de González-Alcaraz, 2012).

Curso de agua	NO_3^-	NH_4^+	PO_4^{3-}	Referencia
Rambla de Miranda	33	n.d.	n.d.	SACYR S.A. (1997) ¹
	> 281	n.d.	> 2	Álvarez-Rogel <i>et al.</i> (2006)
	69	n.d.	2	González-Alcaraz <i>et al.</i> (2012)
Rambla del Albuñón	63	n.d.	7	SACYR S.A. (1997) ¹
	73	4	6	Velasco <i>et al.</i> (2006)
	54	6	1	Ruiz-Martínez (2006)
	> 186	> 12	> 16	Álvarez-Rogel <i>et al.</i> (2006)
Rambla del Miedo	> 54	> 31	> 38	Álvarez-Rogel <i>et al.</i> (2006)
	38	n.d.	9	González-Alcaraz <i>et al.</i> (2012)

n.d.: no dato, ¹ datos citados en Martínez y Esteve (2000, 2002).

2.1.2.2. IMPACTOS OCASIONADOS POR EL CRECIMIENTO DE LA POBLACIÓN Y EL TURISMO

La zona litoral de La Manga del Mar Menor estaba ocupada por dunas y vegetación de matorrales, que llegaron con pocos cambios hasta los años 60 del siglo XX, década en la cual el paraje fue promocionado para el turismo y las grandes construcciones comenzaron paulatinamente a poblar el paisaje considerando su posición estratégica entre dos mares. Desde principios de los años 70, el aumento del turismo en la zona ha impulsado la construcción de nuevas playas, puertos y canales.

El crecimiento urbanístico acelerado ha provocado y sigue provocando carencias en los sistemas de saneamiento y depuración de los municipios costeros del Mar Menor. Durante los episodios de fuertes tormentas son comunes los vertidos de aguas residuales a la laguna desde depuradoras, como las de las poblaciones de Los Alcázares

y de Torre Pacheco a través de la Rambla del Albuñón, desencadenando en varias ocasiones la muerte de peces y el cierre de playas, con una gran repercusión social. Ante esa situación, el Mar Menor fue declarado zona sensible a la eutrofización en junio de 2001 bajo el amparo de la Directiva 91/271/CEE sobre vertidos de aguas residuales urbanas (Velasco *et al.*, 2006).

A su vez, el turismo ha reclamado la creación de nuevas playas, y para ello se hace necesario la extracción de arena, resaltando las realizadas a finales de la década de los 80 en los fondos del interior de la laguna, con la consiguiente alteración de las comunidades acuáticas (Pérez-Ruzafa *et al.*, 2005). Además, frecuentemente se realizan dragados de las zonas de baño y de los puertos deportivos, lo que conlleva un efecto negativo sobre las comunidades sumergidas de la laguna.

2.1.2.3. IMPACTOS DE LAS ACTIVIDADES MINERAS

La Sierra Minera de Cartagena-La Unión, en las proximidades del Mar Menor, ha mantenido durante 2500 años una importante actividad extractiva, hasta 1991, año en el que cesaron definitivamente las actividades debido a la crisis económica y a los conflictos con los pueblos cercanos, que se veían amenazados por la proximidad de las explotaciones mineras a sus casas (Conesa *et al.*, 2008). Los principales minerales extraídos fueron pirita (FeS_2), galena (PbS), blenda (ZnS), cerusita (PbCO_3), casiterita (SnO_2) y óxidos de hierro (Martos-Miralles *et al.*, 2001). Durante el proceso de lavado del mineral, el principal tipo de residuo producido eran los lodos, que tradicionalmente se vertían a los cauces de las ramblas que drenan la Sierra, con el consiguiente transporte y deposición en la laguna del Mar Menor. Estos arrastres de estériles mineros también han contribuido a la colmatación del Mar Menor (Pérez-Ruzafa *et al.*, 1991; Díaz del Río, 1993).

Numerosos autores han determinado las concentraciones de metales pesados en los sedimentos de la laguna del Mar Menor (Tabla 2.2). Estos estudios han puesto de manifiesto el alto grado de contaminación metálica que persiste desde hace más de 40 años en los sedimentos de la laguna, principalmente en la cubeta Sur, donde

descargan las ramblas que drenan la zona minera (Simonneau, 1973; De León *et al.*, 1982; Auernheimer *et al.*, 1984, 1996; Rodríguez-Puente *et al.*, 2001; Marín-Guirao *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c; María-Cervantes *et al.*, 2009). Los metales pesados también han ido a parar a los humedales que circundan la laguna en su zona Sur, como es el caso de los saladares de la Marina del Carmolí y Lo Poyo (Tabla 2.2) (Jiménez-Cárceles *et al.*, 2008; María-Cervantes *et al.*, 2009; Conesa *et al.*, 2011, 2014).

Tabla 2.2. Concentraciones de metales pesados (cadmio -Cd-, cobre -Cu-, plomo -Pb- y zinc -Zn-) en suelos y sedimentos (mg kg^{-1}) en el Mar Menor y en los saladares de la Marina del Carmolí y Lo Poyo (modificado de González-Alcaraz, 2012).

	Lugar	Metal				Ref.
		Cd	Cu	Pb	Zn	
Sedimento	Mar Menor	0,3–0,6	n.d.	30–90	130	1
	Mar Menor	> 7	n.d.	> 10000	> 7000	2
	Rambla del Miedo	16	42	2250	2850	3
Suelo	Marina del Carmolí	> 100	> 450	> 150000	> 60000	4
	Saladar de Lo Poyo	n.d.	110	8000	6940	5

n.d.: no dato, ¹ Sanchiz *et al.* (2000), ² Marín-Guirao *et al.* (2005c), ³ García-García (2004), ⁴ Jiménez-Cárceles *et al.* (2006), ⁵ Álvarez-Rogel *et al.* (2004).

2.1.3. LA LAGUNA DEL MAR MENOR EN 2016

Durante años la laguna del Mar Menor ha tenido la capacidad de amortiguar los impactos sufridos de manera que las consecuencias, aunque han afectado a la laguna, no han sido claramente visibles desde el exterior. No obstante, en 2016 se produjo una masiva proliferación de plancton y algas planctónicas en la columna de agua, restringiendo el paso de la luz y provocando la muerte de organismos bentónicos. El mal estado del agua se puso de manifiesto en los meses de primavera y provocó una reacción general de repulsa por parte de la población que hasta entonces no se había conocido. La llegada del verano agravó la situación y acentuó las protestas de los veraneantes debido al mal estado del agua (Fotografía 2.3).

La difusión mediática sobre el mal estado de la laguna del Mar Menor ha sido tal, que en el verano del 2016 multitud de titulares plagaron los periódicos, tales como: *“No hay nada que salvar en el Mar Menor, es un charco de agua podrida”* (Fuente: La Opinión de Murcia, 05/08/2016), *“El Mar Menor está al borde de la muerte”* (Fuente: La Opinión de Murcia, 13/08/2016) o *“Aparecen cientos de peces muertos en La Manga del Mar Menor”* (Fuente: www.lacrónicadelpajarito.es, 10/09/2016).



Fotografía 2.3. Aspecto del agua de la laguna del Mar Menor en el verano de 2016 (Fuente: Diario de La Manga).

La Administración regional puso en marcha una nueva legislación (Orden del 16 de junio de 2016 publicada en el BORM) en relación a los programas de actuación sobre las zonas vulnerables en la Región de Murcia. Asimismo, la Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente de la CARM creó un Comité de Asesoramiento Científico del Mar Menor (Orden de 22 julio de 2016) para planificar y coordinar un conjunto de actuaciones para la mejora del estado de la laguna. Entre las actuaciones a corto plazo puestas en marcha para reducir los vertidos al Mar Menor destacan el sellado de las tuberías que vierten salmueras de los pozos de riego al Mar Menor a través de la Rambla del Albujión (Fotografías 2.4, 2.5 y 2.6), realizar obras para la conducción de las aguas de drenaje de la Rambla del Albujión hacia la desalobradoradora situada junto a la estación depuradora de aguas residuales de Cabo de Palos, y la puesta en marcha de filtros verdes.



Fotografía 2.4. Agentes antidisturbios de la Guardia Civil protegiendo las labores de sellado de las tuberías de vertidos de las explotaciones agrarias del Campo de Cartagena en la Rambla del Albujión (Fuente: www.efeverde.com).



Fotografía 2.5. Un operario trabaja en el sellado de tuberías en las cercanías de Torre Pacheco (Fuente: www.laopiniondemurcia.es).



Fotografía 2.6. Tuberías que vierten aguas residuales (salmuera) en la Rambla del Albujión y van a parar a la laguna del Mar Menor (Fuente: www.7tvregiondemurcia.es).

2.2. EL SALADAR DE LA MARINA DEL CARMOLÍ

2.2.1. LOCALIZACIÓN

El saladar de la Marina del Carmolí ($37^{\circ}41'42''$ N, $0^{\circ}51'52''$ W) está situado a orillas del Mar Menor, en el término municipal de Cartagena, entre las poblaciones de Los Alcázares (al Norte) y Los Urrutias (al Sur). Su superficie es de $3,2 \text{ km}^2$ (318,6 ha), con una longitud de unos 2,9 km en dirección Norte–Sur y con una anchura máxima de unos 1,7 km (CARM, 2005). Está limitado en su extremo Norte por la Rambla del Albujón, al Sur por la Urbanización El Carmolí y áreas agrícolas adyacentes, al Este por el Mar Menor y al Oeste por la Autopista AP–7 (Figura 2.3). Además, la carretera que llega a El Carmolí y Los Urrutias, y que discurre paralela a la línea de costa, atraviesa la zona de Norte a Sur y lo divide en 2 partes. En la más estrecha, que queda entre dicha carretera y el mar, se localizan almarjales y varias charcas someras, algunas de las cuales permanecen con agua durante todo el año.

En el año 2000 se realizó por parte de la CARM un inventario regional de humedales (Vidal-Abarca *et al.*, 2003). En dicho inventario se cataloga a la Marina del Carmolí como un criptohumedal, que es aquel humedal en el que la lámina de agua superficial no existe o presenta una extensión muy reducida o de carácter temporal, si bien el nivel freático siempre queda lo suficientemente próximo a la superficie del suelo como para permitir el desarrollo de una comunidad de plantas freatófilas (especies que absorben el agua de una fuente permanente en el terreno) y la presencia de un sustrato saturado en agua.

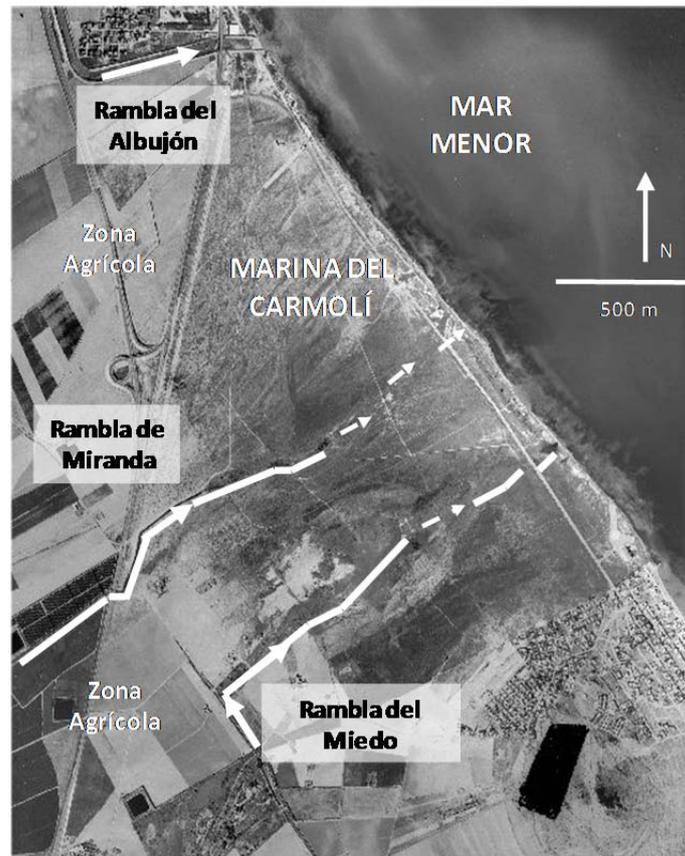


Figura 2.3. Saladar de la Marina del Carmolí.

2.2.2. CURSOS DE AGUA

La Marina del Carmolí constituye una superficie ligeramente inclinada hacia la laguna del Mar Menor en la que confluye la red de drenaje de zonas topográficamente más elevadas. Al humedal llegan por el Oeste tres ramblas del Campo de Cartagena, cuyos caudales permanecen activos incluso en verano debido al superávit de aguas de regadío y a los vertidos de aguas residuales (salmueras y aguas de depuradoras) a sus cauces. Una de ellas es la Rambla del Miedo, procedente de la Sierra Minera de Cartagena–La Unión, que hasta hace pocos años recibía descargas de agua de la depuradora de El Algar–La Loma–Los Urrutias (Álvarez-Rogel *et al.*, 2006), y que, además, ha recibido residuos mineros procedentes de la Sierra de Cartagena–La Unión (Jiménez-Cárceles *et al.*, 2008). Otra de ellas es la Rambla de Miranda, que recorre las zonas de agricultura intensiva del Campo de Cartagena y recibe las aguas de drenaje de las explotaciones agrícolas hasta llegar al humedal (Álvarez-Rogel *et al.*, 2006; González-Alcaraz *et al.*, 2012). Ambas atraviesan el saladar de Oeste a Este e inundan extensas zonas hasta desembocar en el Mar Menor. La tercera, la Rambla del Albuji3n

(Figura 2.4), es la más extensa del Campo de Cartagena, con una longitud de ≈ 30 km, cuyos desbordamientos hasta principios de los años 90 constituían el mayor aporte hídrico de aguas continentales al saladar, y que se encuentra actualmente encauzada hasta su desembocadura y no lo inunda, pero es la única con un flujo permanente de agua que fluye a la laguna del Mar Menor en sus últimos 5–8 km (Moreno-González, 2015).

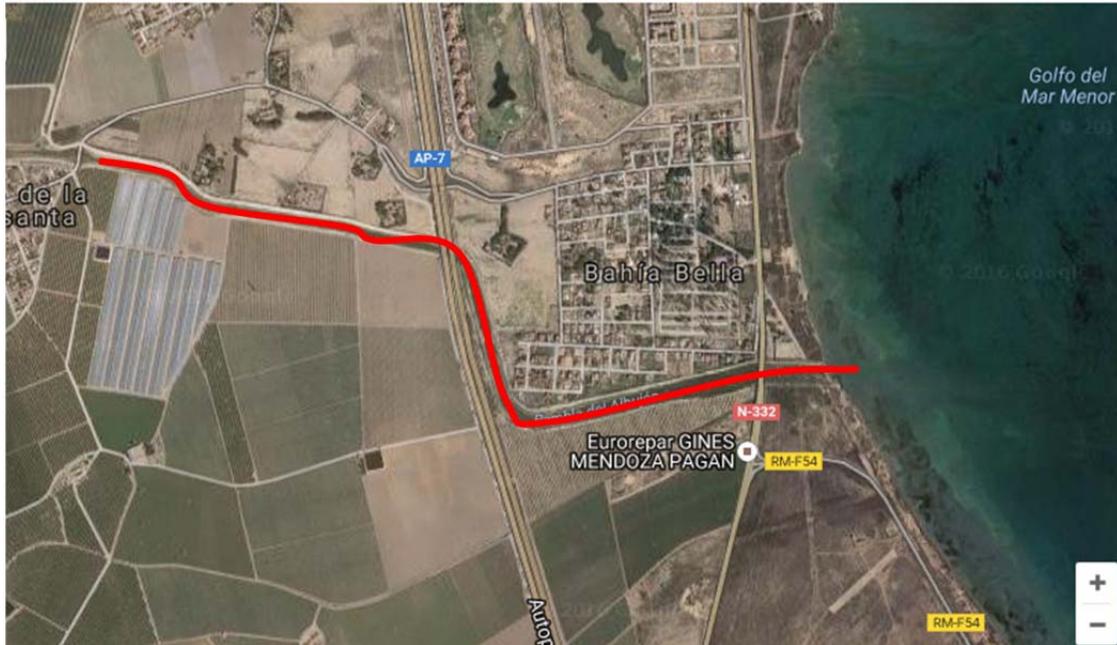


Figura 2.4. Imagen satélite de la desembocadura de la Rambla del Albuñón en el Mar Menor en la que se aprecia el cauce desviado en forma de L (Fuente: Google Imágenes 2016).

2.2.3. SUELO Y VEGETACIÓN

Los principales tipos de suelos y las relaciones suelo–vegetación en el saladar de la Marina del Carmolí han sido estudiados por Ortiz *et al.* (1995) y Álvarez-Rogel *et al.* (2000, 2001). Los suelos son principalmente Solonchaks Cálcidos y Gléicos (WRB, 2006). En algunos se ha observado la existencia de un horizonte de textura fina sobre una costra calcárea (< 1 m de profundidad en algunas zonas). El pH del suelo suele ser > 7 , la presencia de carbonato cálcico (CaCO_3) es abundante, excepto en ciertas zonas afectadas por los residuos mineros, y la salinidad es una constante existiendo fuertes gradientes desde suelos hipersalinos a otros de baja salinidad (Jiménez-Cárceles, 2006).

De acuerdo a Carreño *et al.* (2007), en la Marina del Carmolí aparecen distintas unidades de vegetación sobre los suelos arenosos de playas y dunas, la estepa salina, el almarjal y el carrizal. Esta clasificación se hace en función del hábitat mayoritario, de acuerdo a la Directiva Hábitat (92/43/CEE), aunque en todas las unidades aparecen pequeñas manchas de éstos y otros hábitats (Pardo *et al.*, 2006). La vegetación se distribuye dependiendo de las condiciones de inundación y de salinidad del suelo, factores que están fuertemente afectados por la microtopografía del terrero (Álvarez-Rogel, 1997). En las ramblas y zonas adyacentes, el carrizal de *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud ocupa casi la totalidad de la superficie, mientras que en sectores más alejados de los cauces, pero que también se anegan, se desarrollan juncales con predominio de *Juncus maritimus* Lam., acompañado por *Juncus acutus* L. y *Scirpus holoschoenus* L. Cuando la salinidad se hace más acusada aparecen matorrales de *Limonium delicatulum* (Girard) O. Kuntze y almarjales de *Arthrocnemum macrostachyum* (Moris.) Moris y *Sarcocornia fruticosa* (L.) A. J. Scott, dependiendo del grado de humedad e inundación. En los sectores topográficamente más elevados se desarrollan albardinales de *Lygeum spartum* L. con *Halimione portulacoides* (L.) Aellen, *Suaeda vera* Forsskal ex J.F. Gmelin, *Frankenia corymbosa* L., *Asparagus horridus* L. J.A. Murray, *Sedum sediforme* (Jacq.) Pau y numerosas plantas anuales. La zona de dunas en contacto con la playa se encuentra ocupada por especies típicas de suelos arenosos como *Sporobolus pungens* (Schreber) Kunth y *Elymus farctus* C. Presl. (Álvarez-Rogel, 1997; Álvarez-Rogel *et al.*, 2001; CARM, 2005).

2.2.4. USOS EN EL SALADAR

El saladar es propiedad en su mayor parte del Ministerio de Defensa y ha sido utilizado con cierta frecuencia para la realización de maniobras y ejercicios militares, lo que ha facilitado a su vez que esta zona no haya sido explotada para su urbanización o laboreo. Estas maniobras están muy restringidas desde hace años, a partir de que la zona fuera protegida desde el punto de vista medioambiental (Jiménez-Cárceles, 2006).

Aparte del uso militar, las actividades más habituales incluyen la recolección de plantas con fines ornamentales y la recogida de caracoles y espárragos en ciertas zonas del humedal que son también utilizadas para el pastoreo (Jiménez-Cárceles, 2006). También se practican actividades recreativas y de ocio en la zona costera del saladar (CARM, 2005). Además, la Marina del Carmolí se ha utilizado de forma relativamente frecuente para el desarrollo de actividades cinegéticas, incluso a veces la caza ilegal con galgos (CARM, 2005).

La poda, quema y control de poblaciones de *Phragmites* en las ramblas del Miedo y de Miranda son acciones realizadas habitualmente por la Administración con el fin de impedir la expansión de esta especie hacia otras zonas del saladar (Ballester, 2002; Jiménez-Cárceles, 2006; Álvarez-Rogel *et al.*, 2007).

2.2.5. IMPACTOS EN EL SALADAR

Muchas de las actividades que se desarrollan en el humedal (uso recreativo no controlado, prácticas de recolección y caza), así como otras presentes en zonas cercanas, constituyen factores de degradación del mismo, afectando directamente a las comunidades de animales y vegetales que allí se presentan.

La actividad cinegética supone un peligro para la avifauna nidificante. Por otro lado, la recolección de espárragos y caracoles, actividad que se realiza bastante frecuentemente, puede afectar negativamente a la tranquilidad de las aves para su reproducción si no se regula de forma adecuada. La recolección de huevos y pollos de aves acuáticas, aunque no se realiza de forma sistemática, tiene cierta tradición en la zona (CARM, 2005).

El uso recreativo no controlado también tiene un efecto negativo debido al pisoteo de la vegetación y al deterioro de la estructura del suelo, afectando negativamente al crecimiento de las plantas (CARM, 2005).

El saladar también se encuentra afectado por la presencia de escombros y otros residuos sólidos, y por cultivos de regadío cercanos a las ramblas que pueden ser un foco de emisión de nutrientes (Jiménez-Cárceles, 2006).

Junto con la existencia de vertidos a las ramblas del Miedo y de Miranda, otro fuerte impacto es la presencia de un sector cubierto por residuos mineros procedentes de la Sierra Minera de Cartagena-La Unión, que han sido transportados hacia allí por la Rambla del Miedo. La zona ocupada por los residuos se encuentra en la parte Suroeste del saladar, pudiendo distinguirse el sector más afectado como una zona sin vegetación o escasamente ocupada por taráis y carrizos (Jiménez-Cárceles, 2006).

2.3. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Rogel, J. 1997. Relaciones suelo-vegetación en saladares del sureste de España. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, Murcia, España. 456 pp.

Álvarez-Rogel, J., Alcaraz, F., Ortiz, R. 2000. Edaphic gradients and plant zonation in mediterranean salt-marshes of SE Spain. *Wetlands*, 20: 357-372.

Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F.J., Egea-Nicolás, C. 2006. Phosphorus and nitrogen content in the water of a coastal wetland in the Mar Menor lagoon (SE Spain): relationships with effluents from urban and agricultural areas. *Water, Air and Soil Pollution*, 173: 21-38.

Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F.J., Roca, M.J., Ortiz, R. 2007. Changes in soils and vegetation in a Mediterranean coastal salt marsh impacted by human activities. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73: 510-526.

Álvarez-Rogel, J., Ortiz, R., Vela de Oro, N., Alcaraz, F. 2001. The application of the FAO and US Soil Taxonomy systems to saline soils in relation to halophytic vegetation in SE Spain. *Catena*, 45: 73-84.

- Álvarez-Rogel, J., Ramos, M.J., Delgado, M.J. Arnaldos, R. 2004. Metals in soils and above-ground biomass of plants from a salt marsh polluted by mine wastes in the coast of the Mar Menor lagoon, SE Spain. *Fresenius Environmental Bulletin*, 13: 274–278.
- Auernheimer, C., Chinchón, S., Pina, J.A. 1996. Lead pollution in bivalve shells. Mar Menor, Spain. *Archives Des Sciences*, 49: 87–98.
- Auernheimer, C., Llavador, F., Pina, J.A. 1984. Chemical minority elements in bivalve shells. A natural model (Mar Menor, Spain). *Archives Des Science*, 37: 313–331.
- Ballester, R. 2002. Los humedales de la Región de Murcia: paradigma de los humedales de zonas áridas. En: Seminario sobre Humedales mediterráneos: políticas para su gestión y conservación. CEMACAM–Torre Guil, Murcia, España.
- CARM (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia). 2005. Plan de Ordenación de los Recursos Naturales de los Espacios Abiertos e Islas del Mar Menor y Cabezo Gordo. Conserjería de Industria y Medio Ambiente. Dirección General del Medio Natural.
- Carreño, M.F., Pardo, M.T., Esteve, M.A., Martínez, J. 2007. Dinámica de hábitats de los humedales litorales de la laguna del Mar Menor (Murcia, SE de España) asociada a los cambios en el régimen hidrológico de su cuenca drenante. *Anales de Biología*, 29: 13–22.
- Conesa, H.M., Jiménez-Cárceles, F.J. 2007. The Mar Menor lagoon (SE Spain): a singular natural ecosystem threatened by human activities. *Marine Pollution Bulletin*, 54: 839–849.
- Conesa, H.M., María-Cervantes, A., Álvarez-Rogel, J., González-Alcaraz, M.N. 2011. Influence of soil properties on trace element availability and plant accumulation in

a Mediterranean salt marsh polluted by mining wastes: Implications for phytomanagement. *Science of the Total Environment*, 409: 4470–4479.

Conesa, H.M., María-Cervantes, A., Álvarez-Rogel, J., González-Alcaraz, M.N. 2014. Role of rhizosphere and soil properties for the phytomanagement of a salt marsh polluted by mining wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11: 1353–1364.

Conesa, H.M., Robinson, B.H., Shulin, R., Nowack, B. 2008. Metal extractability in acidic and neutral mine tailings from the Cartagena–La Unión Mining District (SE Spain). *Applied Geochemistry*, 23: 1232–1240.

Conesa-García, C. 1990. El Campo de Cartagena. Clima e hidrología de un medio semiárido. Editan Universidad de Murcia, Ayuntamiento de Cartagena y Comunidad de Regantes del Campo de Cartagena. Murcia, España.

De León, A.R., Guerrero, J., Faraco, F. 1982. Evolution of the pollution of the coastal lagoon of Mar Menor. VI Journées Étud. Pollutions. C.I.E.S.M, Cannes, Francia. pp. 355–358.

Díaz del Río, V. 1993. Estudio geoambiental del Mar Menor. Monografías del Instituto Español de Oceanografía, Nº 4. Madrid, España.

Fenoll, J., Sáez, J. 2009. Cuantificación y evolución de la carga contaminante de nutrientes y plaguicidas en aguas del Mar Menor y su relación con los aportes hídricos de la Rambla del Albuñón y otros aportes subterráneos. En: El Mar Menor. Estado actual del conocimiento científico. Fundación Cluster, Murcia, España, pp. 245–284.

García-García, C. 2004. Impacto y riesgo medioambiental en los residuos minerometalúrgicos de la Sierra de Cartagena–La Unión. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia, España.

- García-Pintado, J., Barberá, G., Erena, M., Castillo, V.M. 2009. Calibration of structure in a distributed forecasting model for a semiarid flash flood: dynamic surface storage and channel roughness. *Journal of Hydrology*, 377: 165–184.
- García-Pintado, J., Martínez-Mena, M., Barberá, G., Albadalejo, J., Castillo, V.M. 2007. Anthropogenic nutrient sources and loads from a Mediterranean catchment into a coastal lagoon: Mar Menor, Spain. *Science of the Total Environment*, 373: 220–239.
- González-Alcaraz, M.N. 2012. Dynamic of nitrogen, phosphorus and metals in eutrophic wetlands affected by mine wastes. Effects of liming on plant growth and metals mobility. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia, España. 231 pp.
- González-Alcaraz, M.N., Egea, C., Jiménez-Cárceles, F.J., Párraga, I., María-Cervantes, A., Delgado, M.J., Álvarez-Rogel, J. 2012. Storage of organic carbon, nitrogen and phosphorus in the soil–plant system of *Phragmites australis* stands from a eutrophicated Mediterranean salt marsh. *Geoderma*, 185–186: 61–72.
- Jiménez-Cárceles, F.J. 2006. Papel de los suelos de los humedales del entorno del Mar Menor en la reducción de impactos ambientales causados por aguas eutrofizadas y residuos mineros: el caso de la Marina del Carmolí. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia, España. 261 pp.
- Jiménez-Cárceles F.J., Álvarez-Rogel, J. 2008. Phosphorus fractionation and distribution in salt marsh soils affected by mine wastes and eutrophicated water: A case study in SE Spain. *Geoderma*, 144: 299–309.
- Jiménez-Cárceles, F.J., Álvarez-Rogel, J., Conesa-Alcaraz, H.M. 2008. Trace element concentrations in salt marsh soils affected by wastes from metal sulphide mining areas. *Water, Air and Soil Pollution*, 188: 283–295.

- Jiménez-Cárceles, F.J., Egea, C., Rodríguez-Caparrós, A.B., Barbosa, O.A., Delgado, M.J., Ortiz, R., Álvarez-Rogel, J. 2006. Contents of nitrogen, ammonium, phosphorus, pesticides and heavy metals, in a salt marsh in the coast of the Mar Menor lagoon (SE Spain). *Fresenius Environmental Bulletin*, 15: 370–378.
- Jiménez-Martínez, J., García-Aróstegui, J.L., Hunink, J.E., Contreras, S., Baudron, P., Candela, L., 2016. The role of groundwater in highly human–modified hydrosystems: a review of impacts and mitigation options in the Campo de Cartagena–Mar Menor coastal plain (SE Spain). *Environ. Rev.* DOI: [dx.doi.org/10.1139/er-2015-0089](https://doi.org/10.1139/er-2015-0089).
- Lillo-Carpio, M.J. 1978. Geomorfología litoral del Mar Menor. *Papeles del Departamento de Geografía*, 8: 9–48.
- María-Cervantes, A., Jiménez-Cárceles, F.J., Álvarez-Rogel, J. 2009. As, Cd, Cu, Mn, Pb y Zn contents in sediments and mollusks (*Hexaplex trunculus* and *Tapes decussatus*) from coastal zones of a Mediterranean lagoon (Mar Menor, SE Spain) affected by mining wastes. *Water, Air and Pollution*, 200: 289–304.
- Marín-Guirao, L., Cesar, A., Marín, A., Vita, R. 2005a. Assessment of sediment metal contamination in the Mar Menor coastal lagoon (SE Spain): Metal distribution, toxicity, bioaccumulation and benthic community structure. *Ciencias Marinas*, 31: 413–428.
- Marín-Guirao, L., Cesar, A., Marín, A., Vita, R. 2005b. Establishing the ecological quality status of soft-bottom mining–impacted coastal waters bodies in the scope of the Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 374–387.
- Marín-Guirao, L., Marín-Atucha, A., Lloret-Barba, J., Martínez-López, E., García-Fernández, A.J. 2005c. Effects of mining wastes on a seagrass ecosystem: metal accumulation and bioavailability, seagrass dynamic and associated community structure. *Marine Environmental Research*, 60: 317–337.

- Martínez, J., Esteve, M.A. 2000. Estimación de la entrada de nutrientes de origen agrícola en el Mar Menor mediante un modelo climático. *Mediterránea. Serie de Estudios Biológicos* (17). Publicaciones Universidad de Alicante, Alicante, España.
- Martínez, J., Esteve, M.A. 2002. El papel de las aguas subterráneas en la exportación de nutrientes de origen agrícola hacia la laguna del Mar Menor. En: Fundación Marcelino Botín. *Conflictos entre el desarrollo de las aguas subterráneas y la conservación de los humedales: litoral mediterráneo*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 191–213.
- Martos-Miralles, P., Sansano-Sánchez, A. Baños-Páez, P., Navarro-Cano, J.A., Méndez-Pérez, T. 2001. *Medio Ambiente y Empleo en la Sierra Minera de Cartagena-La Unión*. Edita Fundación Sierra Minera, La Unión, Murcia, España. 256 pp.
- Moreno-González, R., Campillo, J.A., León, V.M. 2013. Influence of an intensive agricultural drainage basin on seasonal distribution of organic pollutants in seawater from a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). *Marine Pollution Bulletin*, 77: 400–411.
- Moreno-González, R. 2015. Fuentes de distribución de microcontaminantes orgánicos regulados y emergentes en la laguna costera del Mar Menor. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, Murcia, España. 219 pp.
- Ortiz, R., Álvarez-Rogel, J., Alcaraz, F. 1995. Soil-vegetation relationships in two salt marshes in southeastern Spain. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 9: 481-493.
- Pardo, M.T., Carreño, M.F., Esteve, M.A., Martínez, J. 2006. V Congreso Ibérico “Gestión y Planificación del Agua”. Faro, Portugal.
- Pérez-Ruzafa, A., Aragón, R. 2002. Implicaciones de la gestión y el uso de las aguas subterráneas en el funcionamiento de la red trófica de una laguna costera. En: Fundación Marcelino Botín. *Conflictos entre el desarrollo de las aguas*

subterráneas y la conservación de los humedales: litoral mediterráneo. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 215–245.

Pérez-Ruzafa, A., Gilabert, J., Gutiérrez, J.M., Fernández, A.I., Marcos, C., Sabah, S. 2002. Evidence of a planktonic food web response to changes in nutrient input dynamics in the Mar Menor coastal lagoon, Spain. *Hydrobiologia*, 475/476: 359–369.

Pérez-Ruzafa, A., Marcos, C., Pérez-Ruzafa, I.M., Ros, J.D. 1987. Evolución de las características ambientales y de los poblamientos del Mar Menor (Murcia, SE España). Universidad de Murcia. *Anales de Biología*, 12: 53–65.

Pérez-Ruzafa, A., Marcos-Diego, C., Gilabert, J. 2005. The ecology of the Mar Menor coastal lagoon: a fast changing ecosystem under human pressure. En: Ethem-Gönenç, I., Wolflin, J.P. (Eds.), *Coastal Lagoons. Ecosystem Processes and Modelling for Sustainable Use and Development*. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. pp. 392–422.

Pérez-Ruzafa, A., Marcos-Diego, C., Ros, D. 1991. Environmental and biological changes related to recent human activities in the Mar Menor (SE of Spain). *Marine Pollution Bulletin*, 23: 747–751.

Pérez-Ruzafa, A., Navarro, S., Barba, A., Marcos, C., Cámara, M.A., Salas, F., Gutiérrez, J.M. 2000. Presence of pesticides throughout trophic compartments of the food web in the Mar Menor lagoon (SE Spain). *Marine Pollution Bulletin*, 40: 140–151.

Rodríguez-Puente, C., Guerrero, J., García, I. M., Jornet, A. 2001. Estudio piloto sobre niveles y efectos del tributilo de estaño (TBT) y metales pesados en el Mar Menor. Instituto Español de Oceanografía. Informe Interno de la Conserjería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia. Murcia, España. 32 pp.

- Ruíz-Martínez, M.M. 2006. Bioacumulación de nutrientes en *Phragmites australis* en la Rambla del Albuñón: Elemento de gestión para la reducción de la contaminación del Mar Menor. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, Murcia, España.
- SACYR S.A. 1997. Análisis y caudales de los drenajes y ramblas del Campo de Cartagena. Documento Técnico Confederación Hidrográfica del Segura. Murcia, España. 21 pp.
- Sanchiz, C., García-Carrascosa, A. M., Pastor, A. 2000. Heavy metal contents in soft-bottom marine macrophytes and sediments along the Mediterranean coast of Spain. *Marine Ecology*, 21: 1–16.
- Simonneau, J. 1973. Mar Menor: Evolution Sédimentologique et Géochimique récente du remplissage. Tesis Doctoral. Université Paul Sebatier de Toulouse, Toulouse, Francia. 172 pp.
- Velasco, J., Lloret, L., Millán, A., Barahona, J., Abellán, P., Sánchez-Fernández, D. 2006. Nutrient and particulate inputs into the Mar Menor lagoon (SE Spain) from an intensive agricultural watershed. *Water, Air and Soil Pollution*, 176: 37–56.
- Vidal-Abarca, M. R., Esteve, M. A., Suárez, M. L. 2003. Los humedales de la Región de Murcia: claves para su interpretación. Instituto de Ciencias Sociales y Ambientales (ICSA) y Dirección General del Medio Natural (Eds.). Conserjería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia, España.
- Victoria-Jumilla, F. 1983. Contaminación y degradación del Mar Menor. Cuadernos populares 6, Serie ecológica. Conserjería de Cultura y Educación de la Región de Murcia. Murcia, España. 25 pp.
- WRC (World Reference Base). 2006. World Soil Resources Reports No. 103. Food and Agriculture Organization for the United Nations. Roma, Italia.

CAPÍTULO 3

Antecedentes y objetivos del trabajo

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

3.1. ANTECEDENTES

La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en el marco de los estudios sobre eutrofización y dinámica de nutrientes en humedales salinos de la costa de la laguna del Mar Menor que se han venido realizando desde el año 2000 en el Grupo de Investigación de Edafología Ambiental, Química y Tecnología Agrícola de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad Politécnica de Cartagena (ETSIA–UPCT).

Los Proyectos de I+D financiados por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (REN2001–2142/GLO), el Ministerio de Ciencia y Tecnología (CGL2004–05807/BOS) y la Fundación Séneca de la Región de Murcia (00593/PI/04) permitieron desarrollar una serie de estudios de campo en los que se identificó y cuantificó las cantidades de nitrógeno (N) y fósforo (P) que penetran al saladar de la Marina del Carmolí, estimándose la capacidad de depuración de éste en función de los balances de entrada y salida (Álvarez-Rogel *et al.*, 2006). Se realizaron extracciones secuenciales para determinar las diferentes formas de P del suelo, a varias profundidades y en diversos sectores (Álvarez-Rogel *et al.*, 2007a; Jiménez-Cárceles y Álvarez-Rogel, 2008). Se estableció la influencia que tiene la entrada de efluentes agrícolas y urbanos sobre los gradientes ambientales y la vegetación (Álvarez-Rogel *et al.*, 2007b), y se hicieron balances anuales de carbono (C) y N en el sistema suelo–planta de los carrizales de *Phragmites australis* (González-Alcaraz *et al.*, 2012b). El establecimiento del balance C/N del suelo permitió comprobar que la mineralización y posterior nitrificación están dificultadas en los periodos más fríos y húmedos del año, activándose cuando suben las temperaturas y el suelo se seca, lo que provoca una pérdida importante del C orgánico del suelo (González-Alcaraz *et al.*, 2012b).

Proyectos posteriores financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia (CGL2007–64915) y la Fundación Séneca de la Región de Murcia (08739/PI/08), y realizados bajo condiciones experimentales de invernadero, revelaron la importancia

de la rizosfera vegetal en los procesos de depuración de las aguas eutrofizadas a lo largo de periodos prolongados de inundación, siendo la desnitrificación el principal mecanismo de retirada del nitrato (NO_3^-) del agua (González-Alcaraz *et al.*, 2011; González-Alcaraz *et al.*, 2013), y permitieron establecer la dinámica de fijación del P (González-Alcaraz *et al.*, 2012a).

Los impactos por vertidos de aguas eutrofizadas en el entorno del Mar Menor, detectados en los trabajos de campo descritos en los párrafos anteriores, han quedado refrendados por las circunstancias sucedidas en el año 2016 sobre la contaminación y eutrofización de la laguna (ver capítulo 2). También ha quedado asumido que los humedales costeros contribuyen activamente a depurar dichas aguas antes de que viertan a la laguna, gracias a los procesos biogeoquímicos que se dan en los suelos saturados de estos sistemas. No obstante, algunos de los procesos implicados en el papel como filtros verdes de los humedales conllevan la emisión de ciertos gases de efecto invernadero (GEI) a la atmósfera como el dióxido de carbono (CO_2) y el óxido nitroso (N_2O). Sin embargo, hasta el momento, nunca se han medido las tasas de emisión de CO_2 y N_2O de los humedales del entorno del Mar Menor. Tampoco se ha analizado en detalle la influencia de la eutrofización en la actividad microbiana del suelo.

Para tratar de profundizar en todos estos aspectos se ha llevado a cabo el proyecto CGL2010–20214 (Relaciones entre los ciclos biogeoquímicos y la función de los humedales como filtros verdes: efecto de la eutrofización, la especie vegetal y el periodo del año sobre el secuestro de carbono), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Parte de los resultados de este proyecto se recogen en la presente Tesis Doctoral.

3.2. OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El **objetivo general** de la Tesis fue estudiar los procesos biogeoquímicos, microbiológicos y fisiológicos en el sistema suelo–agua–planta de humedales del entorno del Mar Menor afectados por aguas eutrofizadas, bajo condiciones alternas de

inundación–secado, a fin de determinar en qué medida la presencia de *Phragmites australis*, la carga de nutrientes (C orgánico, N y P) y el periodo del año influyen en la capacidad de estos sistemas para depurar dichas aguas y su relación con las emisiones de CO₂ y N₂O.

Para alcanzar este objetivo general, se plantearon tres **objetivos específicos**:

1. Evaluar el papel de la carga de nutrientes del agua de inundación y la presencia de *Phragmites australis* en la variabilidad estacional de las propiedades físico–químicas y microbiológicas del suelo, así como de las emisiones de CO₂, en humedales afectados por aguas eutrofizadas.

2. Evaluar la capacidad de eliminación de N–NO₃⁻, así como las emisiones potenciales de N–N₂O del suelo, en humedales afectados por aguas eutrofizadas, y determinar si dichos procesos están condicionados por la carga de nutrientes, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año.

3. Evaluar la capacidad de retención de P en humedales afectados por aguas eutrofizadas y determinar si dicha retención está condicionada por la carga de nutrientes, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año, así como la contribución de los diferentes componentes del suelo y de la planta en la retención de P.

El trabajo consistió en un experimento en mesocosmos realizado con suelos y plantas (*Phragmites australis*) recogidos en el saladar de la Marina del Carmolí. Dicho experimento se llevó a cabo en un invernadero experimental. Se simuló el comportamiento de humedales eutrofizados en dos situaciones: con *Phragmites* y con suelo desnudo, es decir, sin plantas. Los mesocosmos se sometieron a ciclos de inundación–secado a lo largo de 12 meses (abril 2012–abril 2013) con agua eutrofizada de baja carga de nutrientes: 20 mg L⁻¹ NO₃⁻; 0,5 mg L⁻¹ amonio (NH₄⁺); 6 mg L⁻¹ fosfato (PO₄³⁻) -1,95 mg L⁻¹ de P–PO₄³⁻; 10 mg L⁻¹ carbono orgánico disuelto (COD) y de alta

carga de nutrientes: 200 mg L⁻¹ NO₃⁻; 5 mg L⁻¹ NH₄⁺; 60 mg L⁻¹ PO₄³⁻ -19,5 mg L⁻¹ P-PO₄³⁻ -; 100 mg L⁻¹ COD. Se monitorizó regularmente el potencial redox (Eh), el pH y la temperatura del suelo, el CO₂ emanado del suelo a la atmósfera, las emisiones potenciales de N-N₂O del suelo a la atmósfera y el estado fisiológico de las plantas de *Phragmites*, se extrajo y analizó el agua de poro del suelo, y se analizó la carga microbiana del suelo. También se analizó el P acumulado en los suelos (incluyendo un procedimiento de fraccionamiento) y en las plantas (raíces, rizomas, tallos y hojas).

La Tesis se ha estructurado de la siguiente forma:

Parte I. Aspectos generales y metodología

- Capítulo 1. Introducción general en la que se repasan los aspectos más destacados sobre los humedales.
- Capítulo 2. Descripción de la laguna del Mar Menor y su entorno, haciendo especial hincapié en el saladar de la Marina del Carmolí.
- Capítulo 3. Antecedentes y objetivos del trabajo.
- Capítulo 4. Diseño experimental y metodología seguida.

Parte II. Resultados y discusión

- Capítulo 5. Descripción y discusión del efecto de la rizosfera de *Phragmites* en los procesos biogeoquímicos del suelo, como aspectos previos y necesarios para abordar la dinámica del N y P en capítulos posteriores. Los contenidos de este capítulo se recogen en el artículo Tercero *et al.* (2015), Response of biogeochemical processes of the water-soil-plant system to experimental flooding-drying conditions in a eutrophic wetland: the role of *Phragmites australis*. *Plant and Soil*, 396: 109–125.

- Capítulo 6. Descripción y discusión de la dinámica del N. Los contenidos de este capítulo se recogen en el artículo Álvarez-Rogel *et al.* (2016), Nitrate removal and potential soil N₂O emissions in eutrophic salt marshes with and without *Phragmites australis*. *Geoderma*, 282: 49–58.
- Capítulo 7. Descripción y discusión de la dinámica del P. Los contenidos de este capítulo se recogen en el artículo Tercero *et al.* (en revisión), Phosphorus retention and fractionation in an eutrophic wetland: a one-year mesocosms experiment under fluctuating flooding conditions. *Journal of Environmental Management*.

Parte III. Conclusiones

- Capítulo 8. Conclusiones generales y consideraciones para el uso de humedales para prevenir la eutrofización de la laguna del Mar Menor.

3.3. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F.J., Egea-Nicolás, C. 2006. Phosphorus and nitrogen content in the water of a coastal wetland in the Mar Menor lagoon (SE Spain): relationships with effluents from urban and agricultural areas. *Water, Air and Soil Pollution*, 173: 21–38.

Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F.J., Egea-Nicolás, C. 2007a. Phosphorus retention in a coastal salt marsh in SE Spain. *Science of the Total Environment*, 378: 71–74.

Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F.J., Roca, M.J., Ortiz, R. 2007b. Changes in soils and vegetation in a Mediterranean coastal salt marsh impacted by human activities. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73: 510–526.

- Álvarez-Rogel, J., Tercero, M.C., Arce, M.I., Delgado, M.J., Conesa, H.M., González-Alcaraz, M.N. 2016. Nitrate removal and potential soil N₂O emissions in eutrophic salt marshes with and without *Phragmites australis*. *Geoderma*, 282: 49–58.
- González-Alcaraz, M.N., Álvarez-Rogel, J., María-Cervantes, A., Egea, C., Conesa, H.M. 2012a. Evolution and phosphorus fractionation in saline Spolic Technosols flooded with eutrophic water. *Journal of Soils and Sediments*, 12: 1316–1326.
- González-Alcaraz, M.N., Egea, C., María-Cervantes, A., Jiménez-Cárceles, F.J., Álvarez-Rogel, J. 2011. Effects of eutrophic water flooding on nitrate concentrations in mine wastes. *Ecological Engineering*, 37: 639–702.
- González-Alcaraz, M.N., Egea, C., Jiménez-Cárceles, F.J., Párraga-Aguado, I., María-Cervantes, A., Delgado, M.J., Álvarez-Rogel, J. 2012b. Storage of organic carbon, nitrogen and phosphorus in the soil–plant system of *Phragmites australis* stands from a eutrophicated Mediterranean salt marsh. *Geoderma*, 185–186: 61–72.
- González-Alcaraz, M.N., Conesa, H.M., Álvarez-Rogel, J. 2013. When liming and revegetation contribute to mobilize metals: learning lessons for phytomanagement of hydric mine soils. *Journal of Environmental Management*, 116: 72–80.
- Jiménez-Cárceles F.J., Álvarez-Rogel, J. 2008. Phosphorus fractionation and distribution in salt marsh soils affected by mine wastes and eutrophicated water: A case study in SE Spain. *Geoderma*, 144: 299–309.
- Tercero, M.C., Álvarez-Rogel, J., Conesa, H.M., Ferrer, M.A., Calderón, A.A., López-Orenes, A., González-Alcaraz, M.N. 2015. Response of biogeochemical processes of the water–soil–plant system to experimental flooding–drying conditions in a eutrophic wetland: the role of *Phragmites australis*. *Plant and Soil*, 396: 109–125.

Tercero, M.C., Álvarez-Rogel, J., Conesa, H.M., Párraga-Aguado, I., González-Alcaraz, M.N. (en revisión). Phosphorus retention and fractionation in an eutrophic wetland: a one-year mesocosms experiment under fluctuating flooding conditions. *Journal of Environmental Management*.

CAPÍTULO 4

Material y métodos

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. RECOGIDA DE MUESTRAS DE SUELO Y PLANTA

Las muestras de suelo y planta se recogieron del saladar de la Marina del Carmolí (ver capítulo 2 para descripción completa de la zona), en zonas dominadas por *Phragmites australis* y en otras sin la presencia de dicha especie, lo que permitió simular el comportamiento de un humedal eutrofizado bajo dos situaciones: con *Phragmites* y con suelo desnudo, es decir, sin plantas. Para los tratamientos con *Phragmites* se recogieron los ≈25 cm superficiales de suelo y las plantas que crecían sobre él. Para el suelo sin plantas se hizo lo mismo. El material se recogió con una pala excavadora que lo colocó sobre un camión para su transporte (Fotografías 4.1 y 4.2). Además, se recogieron varios sacos de arena del sistema de dunas localizado a orillas del Mar Menor, también para su utilización en el experimento, como se verá más adelante.



Fotografía 4.1. Recogida de suelo y plantas de *Phragmites australis* en el saladar de la Marina del Carmolí.



Fotografía 4.2. Pala excavadora cargando sobre un remolque el suelo y las plantas de *Phragmites australis*.

Tabla 4.1. Características de los suelos y la arena empleados en el experimento. Todas las unidades están basadas en peso seco de suelo (media \pm desviación estándar, $n = 6$). CE: conductividad eléctrica. CCC: capacidad de cambio catiónico. CaCO_3 : carbonato cálcico total. LOI: pérdida de materia orgánica por ignición. NT: nitrógeno total. PT: fósforo total. n.d.: no detectado.

Parámetro	Suelo		Arena
	Sin Planta	Con <i>Phragmites</i>	
pH	8,09 \pm 0,04	7,95 \pm 0,09	8,70 \pm 0,04
CE (dS m^{-1})	3,24 \pm 0,05	1,48 \pm 0,22	0,23 \pm 0,01
CCC ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	15,5 \pm 3,9	21,4 \pm 3,6	4,6 \pm 0,9
CaCO_3 (g kg^{-1})	31 \pm 2	28 \pm 1	59 \pm 1
LOI (%)	5,87 \pm 0,16	6,77 \pm 0,28	3,46 \pm 0,04
NT (g kg^{-1})	0,14 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01
PT (g kg^{-1})	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,1 \pm 0,01
Arena (%)	31,4 \pm 2,2	30,5 \pm 0,8	98,0 \pm 1,1
Limo (%)	62,1 \pm 0,1	46,4 \pm 1,6	2,0 \pm 0,6
Arcilla (%)	6,6 \pm 2,3	23,2 \pm 0,6	n.d.

En la Tabla 4.1 se muestran las principales características de los suelos y la arena empleados en el experimento (ver apartado 4.5.1 para la descripción en detalle de los métodos de análisis empleados). Ambos suelos tenían un pH similar (≈ 8) mientras que

la arena tenía un pH ligeramente más básico. Por el contrario, la conductividad eléctrica (CE) en el suelo sin plantas era más elevada que en el suelo con *Phragmites* y muy baja en la arena. El contenido en carbonato cálcico total (CaCO_3) fue similar en ambos suelos de estudio ($\approx 30 \text{ g kg}^{-1}$) mientras que en la arena el contenido era casi del doble que en éstos. La capacidad de cambio catiónico (CCC) así como los contenidos en carbono (C), estimado como pérdida de materia orgánica por ignición (LOI), y nitrógeno total (NT) fueron ligeramente más elevados en el suelo con *Phragmites* mientras que el contenido de fósforo total (PT) fue similar en ambos suelos. La arena mostró contenidos más bajos de LOI, NT y PT. Los suelos sin plantas presentaron una textura franca y los suelos con *Phragmites* una textura franco-limosa.

4.2. CONSTRUCCIÓN Y EQUIPAMIENTO DE LOS MESOCOSMOS EN INVERNADERO

En el interior de un invernadero se prepararon 12 mesocosmos con cajones de metacrilato transparente de 1 cm de espesor, de dimensiones 1 m x 0,5 m x 0,5 m, que se colocaron sobre un soporte metálico construido para tal fin (Figura 4.1). Cada mesocosmo disponía de un grifo en uno de los laterales para poder ser drenados cuando correspondía (ver apartado 4.3). El soporte metálico se construyó con una ligera inclinación para facilitar el drenaje.

El material traído del campo (suelo, arena y plantas) se introdujo en los mesocosmos de la siguiente forma: se colocó primero una capa de ≈ 15 cm de arena (horizonte subsuperficial) (Fotografía 4.3) y encima de ella ≈ 25 cm del suelo recogido (horizonte superficial) y, en los tratamientos con *Phragmites*, las plantas correspondientes. De esta forma se simulaba un perfil edáfico similar al observado en condiciones de campo en la Marina del Carmolí (Álvarez-Rogel *et al.*, 2001, 2007): arriba un horizonte superficial de textura fina y abajo un horizonte subsuperficial arenoso. De los 12 mesocosmos, 6 se rellenaron con el suelo procedente de la zona sin *Phragmites* y los 6 restantes con el suelo y las plantas de *Phragmites*. Una vez preparados, los mesocosmos se regaron durante 4 meses con agua de la red (pH = 7,19; CE = $0,55 \text{ dS m}^{-1}$) para permitir que las condiciones del suelo se estabilizaran y, en los tratamientos con *Phragmites*, el establecimiento de las plantas (fase de

adaptación). Tras este periodo inicial las plantas se cortaron a ras del suelo y se inició la fase experimental.

A continuación cada mesocosmo se introdujo en un depósito de poliéster de mayor tamaño, reforzado con fibra de vidrio (PRFV) (Fotografía 4.4). En un principio no estaba previsto realizar esta opción, pero fue necesaria para mantener la estanqueidad ya que los rizomas de *Phragmites* atravesaron algunas de las juntas de los cajones de metacrilato. Finalmente los mesocosmos se recubrieron con un plástico opaco para simular la oscuridad del perfil del suelo (Fotografía 4.5).



Fotografía 4.3. Detalle del lecho de arena (horizonte subsuperficial) en uno de los mesocosmos.



Fotografía 4.4. Introduciendo los mesocosmos en depósitos estancos de poliéster reforzados con fibra de vidrio (PRFV).



Fotografía 4.5. Detalle de las fundas de plástico opacas para cubrir los depósitos una vez preparados los mesocosmos.

Cada mesocosmo se equipó de la siguiente forma (Figura 4.1):

- Se instalaron 3 electrodos para la medida del pH (Crison 50–50) en el horizonte subsuperficial y 3 en el superficial.
- Se instalaron 3 electrodos para la medida del potencial redox (Eh) (Crison 50–55) en el horizonte subsuperficial y 3 en el superficial.
- Para la recogida de muestras de la solución del suelo (agua de poro) se colocaron 6 muestreadores Rhizon® en el horizonte subsuperficial y 6 en el superficial, que se conectaron a tubos de extensión de polietileno negro de 20 cm de longitud para poder conectarlos, a su vez, mediante conectores apropiados, a jeringas de muestreo de 50 mL (Fotografía 4.6). De esta forma se podían obtener 6 submuestras por profundidad en cada mesocosmo.

- Para la recogida del óxido nitroso (N_2O) emanado desde el suelo se colocaron dos anillos perforados de policloruro de vinilo (PVC) de 10 cm de diámetro y 5 cm de profundidad en la superficie del suelo para el posterior acoplamiento de sendas cámaras de gases. Las cámaras tenían en la parte superior un septum de goma para poder pinchar en él una jeringa y extraer muestras de aire (Fotografía 4.7).
- Para la medida de la temperatura del suelo (T) se insertaban 2 termómetros de pincho digitales en el momento del muestreo hasta ≈ 5 cm de profundidad.

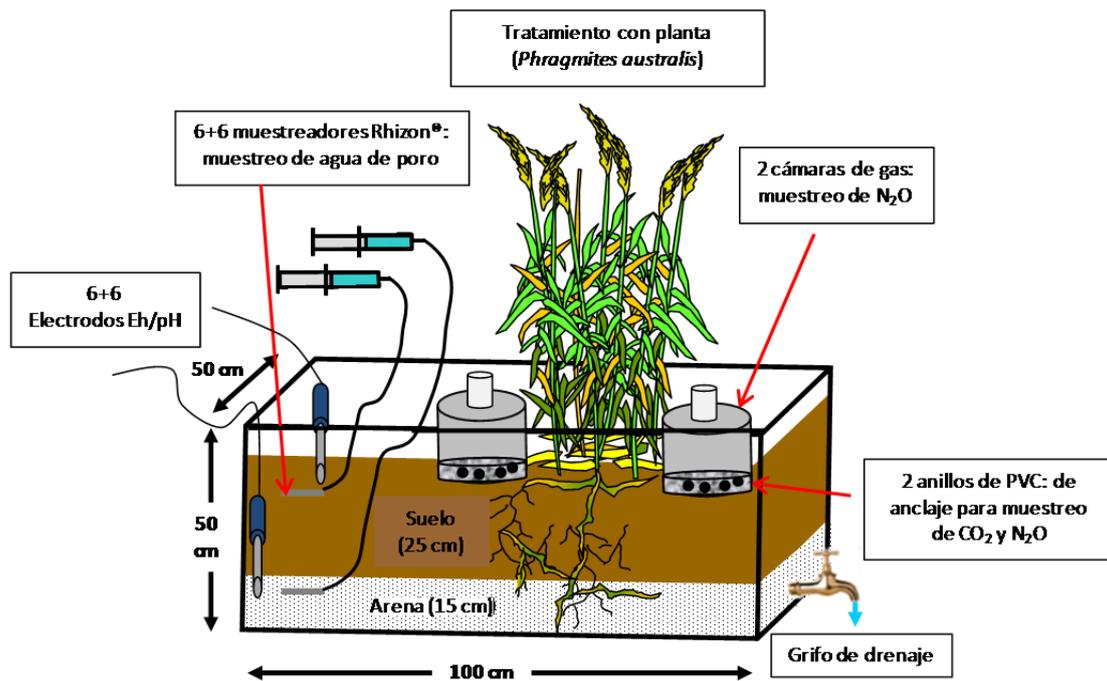


Figura 4.1. Esquema de un mesocosmo experimental. Eh (potencial redox). N_2O (óxido nitroso). CO_2 (dióxido de carbono). PVC: policloruro de vinilo.



Fotografía 4.6. Jeringas de succión de 50 mL acopladas a los tubos de extensión de polietileno que las conectaban con los muestreadores Rhizon®, que se encontraban enterrados, para extraer el agua de poro del suelo.



Fotografía 4.7. Cámaras de policloruro de vinilo (PVC) para la recogida del óxido nitroso (N_2O) emanado desde el suelo. En la fotografía de la izquierda tenemos el conjunto de todas las piezas, con el anillo que se inserta de manera permanente en el suelo y la cámara que se coloca sobre el anillo cuando hay que muestrear (se pueden observar las 2 piezas que la componen: cámara y tapadera que cierra herméticamente y que cuenta, en la parte superior, con un septum de goma para pinchar la aguja de muestreo). En la fotografía de la derecha tenemos la vista cenital del anillo una vez insertado en el suelo. Estos anillos también se utilizaron para insertar la cubeta SRC-1 del equipo CIRAS-2, con el que se midió *in situ* el dióxido de carbono (CO_2) emanado desde el suelo (Fotografía 4.9), cuya cubeta tenía las mismas dimensiones que las cámaras de recogida de gases.

A lo largo de todo el experimento, las medidas de temperatura y humedad en el interior del invernadero quedaron recogidas en un datalogger LOG32 (Fotografía 4.8).



Fotografía 4.8. Datalogger LOG32 utilizado para medir la temperatura y humedad en el interior del invernadero.

4.3. TRATAMIENTOS ENSAYADOS Y DESARROLLO DEL EXPERIMENTO

El experimento consistió en someter a los mesocosmos a ciclos de inundación–secado a lo largo de 12 meses (abril 2012–abril 2013). Para la inundación de los mesocosmos se preparó artificialmente un agua salina de similar composición a la que discurre por el saladar de la Marina del Carmolí ($2,5 \text{ g L}^{-1} \text{ Cl}^-$; $1 \text{ g L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$; $0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$; $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$; $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ K}^+$; $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}^+$), con dos niveles de eutrofización que denominamos de baja y alta carga de nutrientes (aunque se asume que incluso el de baja carga contiene concentraciones elevadas de N, P y carbono orgánico disuelto - COD-). El agua de baja carga de nutrientes ($\text{pH} \approx 7,7$ y $\text{CE} \approx 11,5 \text{ dS m}^{-1}$) contenía: 20 mg L^{-1} de nitrato (NO_3^-), $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de amonio (NH_4^+), 6 mg L^{-1} de fosfato (PO_4^{3-}) - $1,95 \text{ mg L}^{-1}$ de P-PO_4^{3-} - y 10 mg L^{-1} de COD. El agua de alta carga de nutrientes ($\text{pH} \approx 7,2$ y $\text{CE} \approx 12 \text{ dS m}^{-1}$) presentaba una concentración 10 veces mayor de NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} y COD que el agua con baja carga. El COD consistió en una mezcla de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Panreac) y

extracto de carne Sigma–Aldrich (46 % de C orgánico) en una proporción 2:1. Los niveles de eutrofización ensayados se establecieron en base a estudios previos de campo realizados en los cursos de agua que fluyen a través de la Marina del Carmolí (Álvarez-Rogel *et al.*, 2006; González-Alcaraz *et al.*, 2012). De los 12 mesocosmos, 6 (3 sin plantas y 3 con *Phragmites*) se inundaron con agua de baja carga de nutrientes y los 6 restantes (3 sin plantas y 3 con *Phragmites*) con agua de alta carga de nutrientes. Por lo tanto, se ensayaron 4 tratamientos en el experimento: sin planta + baja carga de nutrientes; sin planta + alta carga de nutrientes; *Phragmites* + baja carga de nutrientes; *Phragmites* + alta carga de nutrientes (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Tratamientos ensayados en el experimento.

Tipo de Suelo	Tipo de Agua	
	Baja carga de nutrientes	Alta carga de nutrientes
Suelo sin plantas	3 mesocosmos	3 mesocosmos
Suelo con <i>Phragmites</i>	3 mesocosmos	3 mesocosmos

Ambos tipos de aguas se almacenaron en bidones opacos de 1000 L de capacidad instalados en el interior del invernadero. Cada bidón estaba conectado a un sistema de riego que permitía, de manera automática, introducir el agua en los mesocosmos de los tratamientos correspondientes.

El régimen hídrico consistía en inundar los mesocosmos durante periodos de 3–4 semanas (fases de inundación) y en drenarlos posteriormente durante las siguientes 3–4 semanas (fases de secado). Los ciclos de inundación–secado se repitieron 6 veces durante un total de 44 semanas. Al inicio de cada fase de inundación, el agua se introducía superficialmente en los mesocosmos hasta alcanzar un espesor de lámina de agua de ≈ 5 cm sobre la superficie del suelo. Dicho nivel se mantenía añadiendo pequeñas cantidades de agua cuando era necesario (el volumen de agua necesario para mantener inundados los mesocosmos con *Phragmites* fue ≈ 20 – 25 % mayor debido a la absorción por las plantas). La inundación se iniciaba siempre los domingos, registrándose el volumen de agua añadido a cada mesocosmo. Transcurridas las 3–4

semanas de inundación, los grifos se abrían durante las siguientes 3–4 semanas y se dejaban drenar los mesocosmos. El agua drenada de cada mesocosmo se recogía durante los 3–4 primeros días (hasta que cesaba el goteo) para su cuantificación y posterior análisis.

A lo largo de la Tesis Doctoral, las semanas experimentales están codificadas en base a las fases de inundación (designadas con una I) y de secado (designadas con una S). Con un número tras I o S se identifica la semana del experimento. Por ejemplo, I22 hace referencia a la semana experimental 22, que fue una semana de inundación; S27 hace referencia a la semana experimental 27, que fue una semana de secado.

4.4. RECOGIDA DE MUESTRAS Y MONITORIZACIÓN DE CONDICIONES FÍSICO–QUÍMICAS DEL SUELO

4.4.1. MUESTRAS RECOGIDAS Y PARÁMETROS MEDIDOS AL INICIO Y FINAL DEL EXPERIMENTO

Antes de comenzar con los ciclos de inundación–secado, tras 4 meses de estabilización de los suelos y establecimiento de las plantas de *Phragmites*, y al finalizar el experimento, se tomaron muestras de suelo para el análisis del contenido de P (fraccionamiento del P y P total). No se tomaron muestras iniciales del horizonte subsuperficial arenoso antes de comenzar los ciclos de inundación–secado con el fin de evitar una fuerte perturbación de los mesocosmos experimentales. Al finalizar el experimento, además, se tomaron muestras de *Phragmites* (raíces, rizomas, tallos y hojas) para el análisis del contenido de P en el material vegetal.

4.4.2. MUESTRAS RECOGIDAS Y PARÁMETROS MEDIDOS REGULARMENTE A LO LARGO DEL EXPERIMENTO

La Tabla 4.3 muestra las fechas y los códigos para cada semana de muestreo y los parámetros medidos a lo largo de los 6 ciclos de inundación–secado realizados.

- Fases de inundación. Durante la primera semana de cada fase de inundación, los lunes, miércoles y viernes, se tomaban las medidas de pH, Eh y T, se recogían muestras de agua de poro del suelo (para la medida de la CE y de las concentraciones de COD, nitrógeno disuelto total -NDT-, NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-}) y del gas emanado del mismo (para la medida del N_2O). Los miércoles, además, se realizaban las medidas de la respiración del suelo (dióxido de carbono - CO_2 - emanado del mismo). Tras esta primera semana de inundación, las medidas de pH, Eh, T y CO_2 se realizaban sólo semanalmente mientras que la toma de muestras de agua de poro y gas cada 2 semanas. Dicho esquema de muestreo se llevó a cabo tras comprobar que la mayoría de los cambios en las condiciones físico-químicas del suelo y los procesos asociados a la dinámica del N y P se producían sobre todo durante la primera semana, ralentizándose posteriormente hasta el final. De forma adicional, en cada fase de inundación, se analizaban en las muestras de agua de poro del horizonte superficial determinados parámetros relacionados con el origen de la materia orgánica disuelta (aromaticidad - SUVA_{254} -, compuestos fenólicos solubles totales -Phe- e índice de fluorescencia -IF-). Las mediciones de los parámetros fisiológicos en las plantas de *Phragmites* (extinción fotoquímica -qP- y fotosíntesis neta -Pn-) sólo se pudieron realizar durante la primera mitad del experimento (semanas de I1 a S27), mientras las plantas estaban activas, tomándose muestras al inicio, mitad y final de cada fase de inundación. Al final de cada fase de inundación se recogían, además, muestras de suelo del horizonte superficial para el análisis del carbono de la biomasa microbiana (CBM).
- Fases de secado. Durante la primera semana de cada fase de secado, tras 3 días de abrir los grifos, se tomaban las medidas de pH, Eh, T y CO_2 y se recogían muestras de agua de poro del suelo (para la medida de la CE y las concentraciones de COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-}) y del gas emanado (para la medida del N_2O). A partir de este momento, las medidas de pH, Eh, T y CO_2 se realizaban semanalmente mientras que la toma de muestras de agua de poro y gas cada 2 semanas. A diferencia de las fases de inundación, los cambios observados tras comenzar los secados no eran tan rápidos, por lo que no se consideró necesario un muestreo tan intensivo. Durante cada fase de secado también se analizaban en las muestras de

agua de poro del horizonte superficial los parámetros relacionados con el origen de la materia orgánica disuelta (SUVA₂₅₄, Phe e IF). Las mediciones de los parámetros fisiológicos (qP y Pn) en las plantas de *Phragmites* se realizaron al inicio, mitad y final de cada fase de secado (sólo durante la primera mitad del experimento, como se ha comentado anteriormente). Al final de cada fase de secado se recogían, además, muestras de suelo del horizonte superficial para el análisis del CBM.

Tabla 4.3. Calendario de muestreo durante el experimento. Se designa con una I a las fases de inundación y con una S a las de secado. Fase: *los números entre paréntesis* indican la fase del experimento (por ejemplo, I(1) hace referencia a la primera fase de inundación; S(2) hace referencia a la segunda fase de secado). Semana: *los números detrás de las letras* indican la semana del experimento (por ejemplo, I3 se corresponde con la semana 3 del experimento, que fue una semana de inundación; S6 se corresponde con la semana 6 del experimento, que fue una semana de secado). Eh: potencial redox. T: temperatura del suelo. CE: conductividad eléctrica. COD: carbono orgánico disuelto. NDT: nitrógeno disuelto total. NO₃⁻: nitrato. NH₄⁺: amonio. PO₄³⁻: fosfato. N₂O: óxido nitroso. CO₂: dióxido de carbono. SUVA₂₅₄: aromaticidad. Phe: compuestos fenólicos solubles totales. IF: índice de fluorescencia. qP: extinción fotoquímica. Pn: fotosíntesis neta. CBM: carbono biomasa microbiana.

Fecha	Fase	Semana	Parámetro medido
30.04.12	I(1)	I1	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O
02.05.12		I1	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂ , qP, Pn
04.05.12		I1	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O
08.05.12		I2	pH, Eh, T, CO ₂ , qP, Pn
16.05.12		I3	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂ , SUVA ₂₅₄ , Phe, IF, qP, Pn, CBM
23.05.12	S(1)	S4	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂ , SUVA ₂₅₄ , Phe, IF, qP, Pn
30.05.12		S5	pH, Eh, T, CO ₂ , qP, Pn
07.06.12		S6	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂ , qP, Pn, CBM

Tabla 4.3 (Continua)

Fecha	Fase	Semana	Parámetro medido
11.06.12	I(2)	I7	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O ,
13.06.12		I7	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O , CO_2 , SUVA_{254} , Phe, IF, qP, Pn
15.06.12		I7	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O
21.06.12		I8	pH, Eh, T, CO_2 , qP, Pn
26.06.12		I9	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O , CO_2 , SUVA_{254} , Phe, IF, qP, Pn, CBM
03.07.12	S(2)	S10	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O , CO_2 , SUVA_{254} , Phe, IF, qP, Pn
12.07.12		S11	pH, Eh, T, CO_2 , qP, Pn
18.07.12		S12	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , N_2O , CO_2 , qP, Pn, CBM
23.07.12	I(3)	I13	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O
25.07.12		I13	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O , CO_2 , qP, Pn
27.07.12		I13	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O
22.08.12		I16	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O , CO_2 , SUVA_{254} , Phe, IF, qP, Pn, CBM
28.08.12	S(3)	S17	Eh, pH, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , N_2O , CO_2 , SUVA_{254} , Phe, IF, qP, Pn
05.09.12		S18	qP, Pn
12.09.12		S19	qP, Pn
28.09.12		S21	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , N_2O , CO_2 , SUVA , Phe, IF, CBM
01.10.12	I(4)	I22	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O , SUVA_{254} , Phe, IF, qP, Pn
03.10.12		I22	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O , CO_2 , SUVA_{254} , Phe, IF
05.10.12		I22	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O , SUVA_{254} , Phe, IF
09.10.12		I23	pH, Eh, T, CO_2 , qP, Pn
19.10.12		I24	pH, Eh, T, CO_2 , qP, Pn
23.10.12		I25	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_2O , CO_2 , SUVA_{254} , Phe, IF, qP, Pn, CBM

Tabla 4.3 (Continua)

Fecha	Fase	Semana	Parámetro medido
31.10.12	S(4)	S26	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂
06.11.12		S27	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂ , qP, Pn
13.11.12		S28	pH, Eh, T, CO ₂
20.11.12		S29	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , CO ₂ , SUVA ₂₅₄ , Phe, IF, CBM
10.12.12	I(5)	I30	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, SUVA ₂₅₄ , Phe, IF
12.12.12		I30	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂
14.12.12		I30	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, SUVA ₂₅₄ , Phe, IF
18.12.12		I31	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂
28.12.12		I32	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂
10.01.13		I34	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂ , SUVA ₂₅₄ , Phe, IF, CBM
15.01.13	S(5)	S35	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂
23.01.13		S36	pH, Eh, T, CO ₂
31.01.13		S38	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂ , SUVA ₂₅₄ , Phe, IF, CBM
11.02.13	I(6)	I39	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, SUVA ₂₅₄ , Phe, IF
13.02.13		I39	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂
15.02.13		I39	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, SUVA ₂₅₄ , Phe, IF
19.02.13		I40	pH, Eh, T, CO ₂
05.03.13		I41	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂ , SUVA ₂₅₄ , Phe, IF, CBM
08.03.13	S(6)	S42	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂
14.03.13		S43	pH, Eh, T, CO ₂
21.03.13		S44	pH, Eh, T, CE, COD, NDT, NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , N ₂ O, CO ₂ , SUVA ₂₅₄ , Phe, IF, CBM

4.4.3. PROCEDIMIENTOS PARA LA TOMA DE DATOS Y MUESTRAS

▪ Medidas del pH, Eh, T y CO₂

Para la toma de datos del pH y Eh se utilizaron los electrodos instalados en los mesocosmos, acoplándolos a un equipo portátil Eh/pH-metro (Crison 507) previamente calibrado. Las medidas del Eh fueron corregidas de acuerdo a Vepraskas y Faulkner (2001), añadiendo +200 mV al voltaje medido (valor de referencia del electrodo de Ag/AgCl a 20 °C). La T del suelo se midió en el horizonte superficial, coincidiendo con las medidas de pH y Eh, por medio de los termómetros insertados en el suelo hasta ≈5 cm. Las emisiones de CO₂ desde el horizonte superficial se midieron *in situ* y para ello se utilizó el sistema de cámara cubeta SRC-1 (cámara de respiración del suelo) capaz de captar y transportar el aire hasta el CIRAS-2 (PP-Systems) (Fotografía 4.9).



Fotografía 4.9. Equipo CIRAS-2 (sobre bidón verde) unido mediante interfaz al PC-portátil para el almacenamiento de datos y cubeta SRC-1 acoplada al anillo insertado en el suelo del mesocosmo para la medición *in situ* del dióxido de carbono (CO₂) emanado desde el suelo.

- **Recogida de las muestras de agua de poro del suelo**

Para cada mesocosmo, las 6 submuestras extraídas de cada profundidad con las jeringas se homogeneizaron para obtener una única muestra representativa de cada horizonte. La CE se analizó directamente en las muestras de agua de poro extraídas, mientras que las concentraciones de COD, NDT, NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-} una vez acidificadas con ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Una alícuota intacta de cada muestra se congeló a $-85\text{ }^\circ\text{C}$ para el análisis del SUVA_{254} , Phe e IF.

- **Recogida de los drenajes de los mesocosmos**

Al finalizar cada fase de inundación se abrieron los grifos de los mesocosmos y se recogieron los drenajes en contenedores de plástico durante 3–4 días (Fotografía 4.10). Para evitar pérdidas por evaporación y/o deterioro de las muestras, los contenedores se taparon con un plástico opaco (Fotografía 4.11). Al finalizar el drenaje, se cuantificó el volumen de agua recogido en los contenedores y se recogieron muestras para la medida de las concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-} .



Fotografía 4.10. Contenedor de recogida. Detalle de uno de los grifos para el drenaje de los mesocosmos.



Fotografía 4.11. Contenedores recogiendo los drenajes de los mesocosmos y tapados con un plástico opaco para impedir pérdidas por evaporación y/o deterioro de las muestras.

- **Recogida de las muestras para medir el N_2O emanado desde el suelo**

Para ello se utilizaron las cámaras de PVC descritas en el apartado 4.2 (Fotografía 4.7). A las ≈ 9 a.m. las cámaras se acoplaban a los anillos instalados permanentemente en la superficie del suelo y se inyectaban 100 mL de acetileno (C_2H_2) al 10 % v/v a través del septum de goma, para bloquear la transformación del N_2O a gas dinitrógeno (N_2) (Groffman *et al.*, 1999). Por lo tanto, este método cuantifica las emisiones potenciales, pero no las reales, de N_2O a la atmósfera si nada del N_2O emitido se transformara en N_2 . El C_2H_2 se obtenía en el momento de muestreo por disolución de carburo cálcico (CaC_2) en agua Milli-Q (≈ 100 g de CaC_2 en ≈ 100 mL de agua) (Fotografía 4.12). El C_2H_2 se inyectaba en la cámara con ayuda de una jeringa (Fotografía 4.13), homogeneizando regularmente la atmósfera en el interior de la cámara moviendo de arriba abajo el émbolo de la jeringa (Fotografía 4.14). Las muestras de gas (10 mL) se recogían tras 2, 4 y 6 h, inyectando cada muestra en un vacutainer de 5 mL (Becton Dickinson, NJ, EEUU) y almacenándolas en oscuridad a temperatura ambiente (3–6 días). Tras cada extracción, se inyectaban 10 mL de C_2H_2 mezclado con aire ambiente para reemplazar el volumen extraído y devolver la presión parcial de C_2H_2 en el interior de la cámara. La técnica

de inhibición por acetileno (TIA) presenta diversas limitaciones, ampliamente discutidas en la literatura científica, que pueden conducir a subestimar las tasas de desnitrificación y los flujos de N_2O asociados (Terry y Duxbury, 1985; Bollmann y Conrad, 1997; Groffman *et al.*, 2006; Felber *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2012). Por ejemplo, el C_2H_2 puede no inhibir completamente la reducción del N_2O a N_2 por los microorganismos del suelo y éstos pueden utilizarlo como sustrato. Pero probablemente, uno de los principales inconvenientes es que el C_2H_2 también bloquea la nitrificación, por lo que en sistemas limitantes de N, donde la desnitrificación está fuertemente acoplada a la nitrificación, este método puede subestimar las tasas de desnitrificación. Por ello, en sistemas prístinos, su uso no es aconsejable. Sin embargo, Rudolph *et al.* (1991) encontraron que la TIA era una técnica aceptable para el análisis de las tasas de desnitrificación si la concentración de $N-NO_3^-$ era $\geq 0,14 \text{ mg L}^{-1}$, y Groffman *et al.* (2006) concluyeron que era útil en sistemas con alta carga de NO_3^- . Por lo tanto, en sistemas eutrofizados fuertemente enriquecidos en NO_3^- , como son los que se simulan en la presente Tesis Doctoral, la TIA es considerada un método adecuado para estimar las emisiones potenciales de $N-NO_2$ del suelo a la atmósfera (Theriot *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Arce *et al.*, 2015).



Fotografía 4.12. Producción y extracción del acetileno (C_2H_2) para su inyección en las cámaras de muestreo.



Fotografía 4.13. Introducción del acetileno (C_2H_2) con una jeringa a través del septum de goma en una de las cámaras.



Fotografía 4.14. Removiendo el aire del interior de las cámaras para homogenizar la atmósfera tras la inyección del acetileno (C_2H_2).

▪ **Medidas de parámetros fisiológicos en las plantas de *Phragmites australis***

La determinación del intercambio gaseoso fotosintético y la fluorescencia de clorofilas se realizó al mediodía (al menos 5 repeticiones por mesocosmo), usando la primera hoja totalmente expandida desde el ápice de la planta. La tasa fotosintética neta (P_n) se estimó mediante un analizador portátil de gas por infrarrojos (CIRAS-2, PP System) a un nivel de densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una concentración de CO_2 de $350 \mu\text{mol mol}^{-1}$. La medida de fluorescencia de clorofilas se realizó en la superficie superior (adaxial) de las hojas mediante un fluorímetro portátil de pulso modulado (FMS-2, Hansatech Instruments Ltd.). Las hojas se mantuvieron en oscuridad durante 30 min con la ayuda de pinzas para hoja (Hansatech Instruments Ltd.) para la determinación de F_o (fluorescencia mínima) y F_m (fluorescencia máxima) en este estado. A continuación, las hojas se expusieron durante 15 min a luz actínica ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para la determinación de F_s (fluorescencia en estado estacionario), F_m' (fluorescencia máxima adaptada a la luz) y F_o' (fluorescencia mínima adaptada a la luz). El cálculo de la extinción fotoquímica (qP , ecuación 4.1) y de otros parámetros relacionados con la fluorescencia se realizaron siguiendo las recomendaciones de Maxwell y Johnson (2000).

$$qP = \frac{(F_m' - F_s)}{(F_m' - F_o')}$$

[Ecuación 4.1]

qP : extinción fotoquímica (g cm^{-3})

F_m : fluorescencia máxima en estado estacionario (g cm^{-3})

F_s : fluorescencia en estado estacionario (g cm^{-3})

F_o : fluorescencia mínima en estado estacionario (g cm^{-3})

▪ **Recogida de muestras de las plantas de *Phragmites australis***

Al final del experimento se segó la biomasa aérea de las plantas de *Phragmites*, separando manualmente tallos y hojas. Para estimar la biomasa subterránea se extrajeron 2 bloques de suelo (superficie $\approx 15 \text{ cm}^2$) por mesocosmo (Fotografía 4.15). Dichos bloques se mantuvieron en posición vertical para la medición de la altura, con el fin de estimar su volumen.



Fotografía 4.15. Extracción de bloques de suelo de los mesocosmos para la determinación del volumen, cuantificación de raíces y rizomas de *Phragmites australis* y análisis de las muestras.

A continuación, de cada bloque de suelo se separaron manualmente raíces y rizomas, mediante lavado del sustrato con agua. El material vegetal se lavó con agua destilada, se secó a 65 °C durante 72 h y se pesó. El peso seco de tallos y hojas de cada mesocosmo se correspondió con la biomasa aérea total. La biomasa seca total de raíces y rizomas de cada mesocosmo se calculó en base al peso seco de cada bloque de suelo extraído y al volumen de sustrato de cada mesocosmo (ecuación 4.2). Los valores calculados por bloque de suelo se promediaron para obtener un único valor por mesocosmo.

$$\text{Biomasa}_{\text{total subterránea}} = \frac{\text{Biomasa}_{\text{extraída}} \cdot \text{Volumen suelo}_{\text{total mesocosmo}}}{\text{Volumen suelo}_{\text{extraído}}}$$

[Ecuación 4.2]

4.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

4.5.1. ANÁLISIS DE LOS SUELOS

4.5.1.1. PARÁMETROS FÍSICOS Y FÍSICO–QUÍMICOS

En muestras de suelo tamizadas a 2 mm:

- **pH.** Se estimó mediante el método potenciométrico (Willard *et al.*, 1974; Bates, 1973) en una extracción 1:5 (suelo:agua destilada) tras 2 h de agitación (Karma, 1993). El pH se midió en un pH–metro (Basic 20 CRISON) previamente calibrado.
- **Conductividad eléctrica (CE).** Se midió en el extracto 1:5 (suelo:agua destilada) tras 2 h de agitación, con un conductivímetro (CRISON EC–Metro GLP 31+) previamente calibrado. Unidades en dS m^{-1} .
- **Capacidad de cambio catiónico (CCC).** Se determinó según el método de Bower *et al.* (1952) por saturación del complejo de cambio con acetato sódico (CH_3COONa) 1N a pH 8,2. El exceso de sodio (Na^+) se eliminó con etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) hasta que se obtuvo un percolado con una $\text{CE} < 0,2 \text{ dS m}^{-1}$. El Na^+ absorbido al complejo de cambio se desplazó con acetato amónico ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 1N a pH 7 y se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA, Unicam Solar® System 969). Unidades en $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$.
- **Textura.** Se determinó por el método de la pipeta de Robinson, previa oxidación de la materia orgánica con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y dispersión con hexametáfosfato sódico (NaPO_3)₆ al 5 %. Las fracciones arcilla ($< 2 \mu\text{m}$) y limo ($2\text{--}50 \mu\text{m}$) se separaron por el método de la pipeta de Robinson, mientras que las diversas fracciones de arena ($50\text{--}100$, $100\text{--}250$, $250\text{--}500$, $500\text{--}1000$ y $1000\text{--}2000 \mu\text{m}$) por tamizado con una pila de tamices de luz de malla adecuada ($0,05\text{--}0,1$; $0,1\text{--}0,25$; $0,25\text{--}0,5$; $0,5\text{--}1$; $1\text{--}2 \text{ mm}$ respectivamente). Unidades en %.

- **Extracción secuencial de fósforo (P) y fósforo total (PT).** La extracción secuencial de P se llevó a cabo por modificación del método propuesto por Jensen y Thamdrup (1993), Paludan y Jensen (1995) y Paludan y Morris (1999), y consistió en un esquema de 4 etapas (Figura 4.2):

Etapa 1) Se tomaron ≈ 5 g de suelo y se agitaron (agitador rotatorio, Agitaser Modelo Rotativo 12 F, Barcelona) durante 2 h con 100 mL de cloruro potásico (KCl) 2M a pH 7 en botellas de plástico de 250 mL provistas de obturador y tapadera de rosca. El extracto resultante se pasó a través de filtros de sedimentos de celulosa (7–9 μm , filtros chm). De dicho extracto se obtuvo una fracción reactiva soluble de P inorgánico (PiRS), correspondiente al P soluble e intercambiable con KCl (Pi-Lábil), y una fracción no reactiva soluble de P orgánico (Po-NRS₁). El residuo de suelo que quedó en el papel de filtro, junto con éste, se volvió a introducir en la botella para la siguiente extracción.

Etapa 2) El residuo procedente de la etapa 1 se agitó (agitador rotatorio) durante 17 h con 100 mL de hidróxido sódico (NaOH) 0,1M. Tras el filtrado se obtuvo una segunda fracción de PiRS, correspondiente al P adsorbido a los minerales de Fe, Mn y Al (Pi-Fe/Mn/Al), como los óxidos y oxihidróxidos, y una segunda fracción no reactiva soluble de P orgánico (Po-NRS₂). El residuo de suelo que quedó en el papel de filtro, junto con éste, se volvió a introducir en la botella para la siguiente extracción.

Etapa 3) El residuo procedente de la etapa 2 se agitó (agitador rotatorio) durante 24 h con 100 mL de ácido clorhídrico (HCl) 0,5M. Tras el filtrado se obtuvo una tercera fracción de PiRS, correspondiente al P asociado a compuestos de Ca y Mg (Pi-Ca/Mg), como carbonatos y apatitos. De acuerdo a Paludan y Morris (1999) y Schlichting *et al.*, 2002, la fracción no reactiva soluble de P orgánico en esta extracción es prácticamente inexistente por lo que no se tuvo en cuenta.

Etapa 4) El residuo resultante de la etapa 3 (restos de suelo y filtros utilizados en las extracciones previas) se introdujo en crisoles de porcelana y se calcinó durante 2 h a 520 °C en una mufla eléctrica (P-Selecta select-horn) (Holmboe *et al.*, 2001). Las cenizas se disolvieron con HCl 1M caliente (Paludan y Jensen, 1995; Paludan y Morris, 1999). El P extraído en esta etapa se corresponde con una fracción orgánica refractaria o residual (Po-Res). Esta fracción comprende principalmente P ligado a materia orgánica refractaria, básicamente ligninas y complejos orgánicos muy estables de difícil degradación (Schlichting *et al.*, 2002; Largeau, 2004), aunque también puede incluir P ligado a algunos minerales no extraídos ni con ácido ni con base (Reddy *et al.*, 1999).

El P inorgánico presente en las fracciones reactivas solubles (PiRS) de todos los extractos se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda (λ) de 825 nm de acuerdo con el método de Murphy y Riley (1962) (ver apartado 4.5.2). Las alícuotas de los extractos obtenidos en las etapas 1 y 2 fueron sometidas a una oxidación alcalina con peroxodisulfato potásico ($K_2S_2O_8$) durante 30 min a 121 °C (Koroleff, 1983), en un autoclave (Sterilav AES-28 Trade Raypa®), con el fin de transformar el Po-NRS en PiRS, que fue entonces medido (esta concentración representaba el P total extraído en el paso correspondiente). El P orgánico no reactivo soluble (Po-NRS) se obtuvo por diferencia entre el PiRS total y el PiRS medido inicialmente. Las fracciones Po-NRS₁ y Po-NRS₂ se combinaron para constituir una única fracción de Po-NRS. Esta fracción está constituida por P orgánico fácilmente degradable, junto con P almacenado en bacterias (polifosfatos) y compuestos más estables como el fitato (Emil, 2000).

La suma de las diferentes fracciones de PiRS (Pi-Lábil, Pi-Fe/Mn/Al y Pi-Ca/Mg) se correspondió con la reserva de P inorgánico presente en el suelo, mientras que la suma del Po-NRS y Po-Res con la reserva de P orgánico.

El PT en el suelo se calculó como la suma de las diferentes fracciones obtenidas de acuerdo a Paludan y Morris (1999) y Jiménez-Cárceles y Álvarez-Rogel (2008). Unidades en mg kg^{-1} .

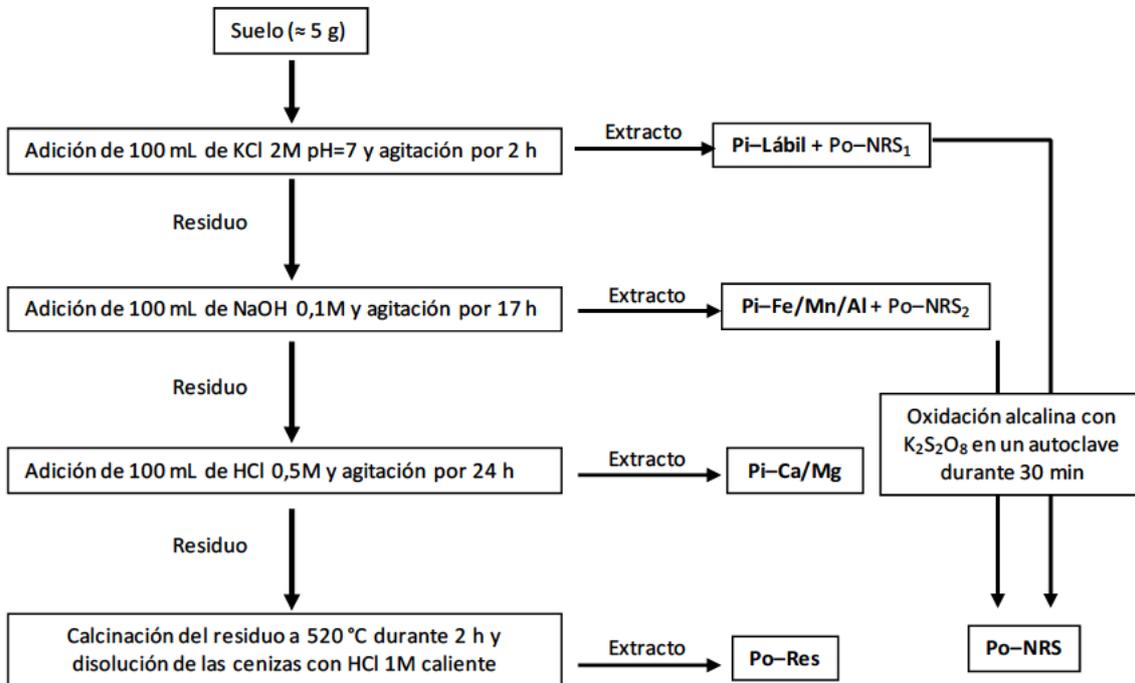


Figura 4.2. Esquema de la extracción secuencial de fósforo (P) del suelo. Pi: fósforo inorgánico. Po: fósforo orgánico. Pi-Lábil: fósforo inorgánico soluble e intercambiable. Pi-Fe/Mn/Al: fósforo inorgánico adsorbido a los minerales de Fe, Mn y Al. Pi-Ca/Mg: fósforo inorgánico asociado a compuestos de Ca y Mg. Po-NRS: fósforo orgánico no reactivo soluble. Po-Res: fósforo orgánico residual.

En muestras de suelo molidas (mortero de ágata):

- **Carbonato cálcico (CaCO_3).** Se determinó por el método del calcímetro de Bernard, con HCl 4M (Hulseman, 1996; Muller y Gatsner 1971). Unidades en g kg^{-1} .
- **LOI (*loss on ignition*, pérdida de peso por ignición).** El contenido total de materia orgánica se determinó en base a la pérdida de peso por calcinación, ignición o al fuego. En una balanza de precisión (Gram-precision Serie SV) se pesaron alícuotas de muestras molidas en crisoles de porcelana y se llevaron a una estufa (P-Selecta universal) con circulación de aire forzado a $100\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h, para después meterlos en una mufla eléctrica (P-Selecta select-horn) y someterlos a la siguiente rampa de temperatura: 1) $200\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h, 2) $400\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h, y 3) $500\text{ }^\circ\text{C}$

durante 6 h. Posteriormente los crisoles se dejaron enfriar en un desecador con el fin de evitar el humedecimiento de las muestras y se pesaron. El LOI se calculó de acuerdo a la ecuación 4.3. Unidades en %.

$$\text{LOI} = \frac{\text{peso}_{\text{muestra seca}} - \text{peso}_{\text{muestra calcinada}}}{\text{peso}_{\text{muestra seca}}} \cdot 100$$

[Ecuación 4.3]

- **Nitrógeno total (NT).** Se determinó en un analizador automático (Leco CHN). Unidades en g kg^{-1} .

4.5.1.2. CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA (CBM)

Se determinó según el método de Vance *et al.* (1987). Este método se basa en la fumigación de la muestra de suelo y posterior determinación de la materia orgánica procedente de la muerte de los microorganismos, a través de su extracción y posterior valoración. Por ello es importante efectuar una limpieza previa de raíces en las muestras de suelo para no sobreestimar la cantidad de CBM. Los análisis se hicieron en muestras de suelo frescas e inalteradas.

Para la fumigación de las muestras de suelo se utilizó cloroformo (CH_3Cl) libre de etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), que se obtuvo mezclando 50 mL de CH_3Cl con otros 50 mL de H_2SO_4 al 5 %, obteniendo sulfato de etilo ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$) soluble en agua. La mezcla se agitó y se descartó la fase acuosa. A continuación se añadieron 50 mL de agua desionizada, se agitó la mezcla y se descartó la fase acuosa. Este último paso se repitió por triplicado hasta la obtención de CH_3Cl libre de $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$. Para la determinación del CBM se trabajó por duplicado, es decir, muestra y control. Las muestras de suelo se fumigaron con CH_3Cl y los controles no. Se pesaron ≈ 10 g de suelo en botellas de 250 mL provistas de obturador y tapadera con rosca y se les añadió 1 mL de CH_3Cl a las muestras. Las muestras se incubaron a 25 °C durante 24 h para que el CH_3Cl difundiese. Tras la incubación, se abrieron las botellas dentro de una campana extractora (Romero Flowtronic) durante 30 min para dejar escapar el CH_3Cl . A continuación, el C de muestras y controles se extrajo por agitación (agitador rotatorio) durante 1 h con 40

mL de sulfato potásico (K_2SO_4) 0,5M. Los extractos se filtraron (2,5 μ m; filtros Whatman 42) y se les insufló aire sintético para liberar durante el burbujeo los posibles restos de CH_3Cl . Los extractos obtenidos se diluyeron con hexametáfosfato sódico ($Na_6P_6O_{18}$) al 5 % (ratio 1:1). Los contenidos de C se midieron en un analizador automático (TOC- V_{CSH} Shimadzu). Los resultados expresados en $mg\ C\ kg^{-1}$ suelo seco se obtuvieron de acuerdo a la ecuación 4.4.

$$CBM = (C_{\text{extracto fumigado}} - C_{\text{control}}) * V_{\text{extractante}} \cdot 1000 \cdot \frac{1}{P_{\text{seco}}}$$

[Ecuación 4.4]

4.5.2. ANÁLISIS DEL AGUA DE PORO Y LOS DRENAJES

- **Conductividad eléctrica (CE).** Se midió con un conductivímetro (CRISON EC-Metro GLP 31+) previamente calibrado. Unidades en $dS\ m^{-1}$.
- **Carbono orgánico disuelto (COD) y nitrógeno disuelto total (NDT).** Se midió con un analizador automático (TOC- V_{CSH} Shimadzu). Unidades en $mg\ L^{-1}$.
- **Nitrato (NO_3^-).** Se determinó según la metodología propuesta por AOAC (1975) en un espectrofotómetro de doble haz de luz (Lambda 25 UV/Vis Perkin Elmer precisely), con cubetas de cuarzo, a dos λ en la región del ultravioleta (220 y 275 nm), previa adición de HCl 1N para eliminar la posible interferencia por presencia de carbonatos. A 220 nm absorben los NO_3^- y la materia orgánica presente en la muestra. A 275 nm absorbe únicamente la materia orgánica, pero la mitad que a 220 nm. La absorbancia debida a los NO_3^- ($A_{\text{corregida}}$) se calculó mediante la ecuación 4.4. Si la corrección en el valor de la absorbancia debida a la materia orgánica ($\lambda = 275\ nm$) es $> 10\ \%$ del valor obtenido a 220 nm, este método de análisis no es recomendable.

$$A_{\text{corregida}} = A_{220} - (A_{275} * 2)$$

[Ecuación 4.4]

$A_{\text{corregida}}$: absorbancia corregida

A_{220} : absorbancia debida a los NO_3^- y a la materia orgánica

A_{275} : absorbancia debida a la materia orgánica

La recta de calibrado se obtuvo a partir de una solución comercial de NO_3^- de 1000 mg L^{-1} , preparando 5 patrones: blanco de NO_3^- de 0 mg L^{-1} , patrón de NO_3^- de 25 mg L^{-1} , patrón de NO_3^- de 50 mg L^{-1} , patrón de NO_3^- de 75 mg L^{-1} y patrón de NO_3^- 100 mg L^{-1} . La concentración de NO_3^- en las muestras se calculó llevando la absorbancia corregida a la recta de calibrado. Unidades en mg L^{-1} .

- **Amonio (NH_4^+).** Se determinó según la metodología propuesta por NEIKER (2005) en un espectrofotómetro de doble haz de luz (Lambda 25 UV/Vis Perkin Elmer precisely), con cubetas de cristal óptico, a una λ en la región del visible de 670 nm por reacción con dicloroisocianurato de sodio ($\text{C}_3\text{Cl}_2\text{N}_3\text{NaO}_3$) y salicilato sódico ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$), produciéndose un “complejo verde esmeralda” cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de NH_4^+ presente en la alícuota de la muestra. Se utilizó nitroprusiato sódico ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$) como catalizador de la reacción, el cuál incrementó la sensibilidad y rapidez en el desarrollo del color.

La recta de calibrado se obtuvo a partir de una solución comercial de NH_4^+ de 1000 mg L^{-1} , preparando 5 patrones: blanco de NH_4^+ de 0 mg L^{-1} , patrón de NH_4^+ de 0,25 mg L^{-1} , patrón de NH_4^+ de 0,50 mg L^{-1} , patrón de NH_4^+ 1 mg L^{-1} y patrón de NH_4^+ de 2 mg L^{-1} . La concentración de NH_4^+ en las muestras se calculó llevando la absorbancia a 670 nm a la recta de calibrado. Unidades en mg L^{-1} .

- **Fosfato (PO_4^{3-}).** Se determinó según la metodología propuesta por Murphy y Riley (1962) en un espectrofotómetro de doble haz de luz (Lambda 25 UV/Vis Perkin Elmer precisely), con cubetas de vidrio óptico, a una λ en la región del visible de 825 nm por reacción con molibdato (MoO_4^{2-}) y ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), produciéndose fosfomolibdato ($(\text{PO}_4\text{12MoO}_3)^{-3}$), un compuesto denominado “azul de molibdeno” cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de PO_4^{3-} presente en la alícuota de la muestra.

La recta de calibrado se obtuvo a partir de una solución comercial de PO_4^{3-} de 1000 mg L^{-1} , preparando 8 patrones: blanco de PO_4^{3-} de 0 mg L^{-1} , patrón de PO_4^{3-} de 0,5 mg L^{-1} , patrón de PO_4^{3-} de 1 mg L^{-1} , patrón de PO_4^{3-} de 2 mg L^{-1} , patrón de PO_4^{3-} de

3 mg L⁻¹, patrón de PO₄³⁻ de 5 mg L⁻¹, patrón de PO₄³⁻ de 10 mg L⁻¹ y patrón de PO₄³⁻ de 20 mg L⁻¹. La concentración de PO₄³⁻ en las muestras se calculó llevando la absorbancia a 825 nm a la recta de calibrado. Unidades en mg L⁻¹.

- **Aromaticidad (SUVA₂₅₄).** Se determinó en un espectrofotómetro multiplacas (Thermo Fisher Scientific Multiskan GO) a partir del cálculo de la absorbancia específica de C a una λ en la región del ultravioleta de 254 nm de acuerdo a Weishaar *et al.* (2003). Las lecturas de absorbancia se corrigieron teniendo en cuenta los niveles de NO₃⁻ previamente determinados en estas muestras. Para asegurar la comparabilidad de las determinaciones en todas las muestras de agua, la concentración de COD se ajustó a 10 mg L⁻¹. Unidades en L mg⁻¹ cm⁻¹.
- **Contenido de compuestos fenólicos solubles totales (Phe).** Se determinó en un espectrofotómetro multiplacas (Thermo Fisher Scientific Multiskan GO) utilizando el método de Folin–Ciocalteu de acuerdo a Pérez-Tortosa *et al.* (2012). Para asegurar la comparabilidad de las determinaciones en todas las muestras de agua, la concentración de COD se ajustó a 10 mg L⁻¹. Los resultados se expresan en μ mol equivalentes de ácido gálico L⁻¹.
- **Índice de fluorescencia (IF).** Se determinó mediante un espectrofluorímetro (NanoDrop 3300 Thermo Scientific). El IF se define como la relación de la intensidad de emisión a 450 o 500 nm con excitación a 370 nm (McKnight *et al.*, 2001). Para asegurar la comparabilidad de las determinaciones en todas las muestras de agua, la concentración de COD se ajustó a 10 mg L⁻¹.

4.5.3. ANÁLISIS DEL ÓXIDO NITROSO (N₂O) EMANADO DESDE EL SUELO

La concentración de N₂O en las muestras de aire se determinó en un cromatógrafo de gases (Agilent C890N: Agilent Technologies, Silicon Valley, Ca, EEUU) equipado con una columna empaquetada tipo Porapack Q y un detector de captura de electrones (ECD), y los datos se expresaron como N–N₂O. La producción de N–N₂O se calculó por

regresión de la concentración de N–N₂O en las cámaras y el tiempo de muestreo (2, 4 y 6 h). Para el cálculo de la concentración de N–N₂O se consideró el nivel de la lámina de agua y el espacio de aire libre en el interior de las cámaras, y se aplicó el coeficiente de Bunsen apropiado teniendo en cuenta la temperatura para corregir la concentración de N–N₂O en el aire en función del N–N₂O disuelto en el agua (Wilhelm *et al.*, 1977). Unidades en $\mu\text{g N-N}_2\text{O h}^{-1} \text{ m}^{-2}$.

4.5.4. ANÁLISIS DE LAS PLANTAS DE *Phragmites australis*

- **Fósforo total (PT).** Una alícuota de las diferentes fracciones de material vegetal (raíces, rizomas, tallos y hojas) se molió finamente con un molinillo (IKA–A11) y se calcinó en una mufla (P–Selecta select–horn) a 480 °C durante 12 h. Las cenizas se disolvieron en HNO₃ 0,6N y se filtraron (7–9 μm , filtros chm) para analizar el contenido de PT. El PT se determinó por el método de Murphy y Riley (1962) (ver apartado 4.5.2). Unidades en mg kg^{-1} .

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 17.0 (SPSS, 2008). Los datos fueron transformados logarítmicamente cuando no cumplían el test de Levene de homogeneidad de varianzas. Para todos los análisis estadísticos realizados, las diferencias se consideraron significativas a $p < 0,05$. Para una descripción detallada de los análisis estadísticos realizados ver capítulos 5, 6 y 7 de la presente Tesis Doctoral.

4.7. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F.J., Egea, C. 2006. Phosphorus and nitrogen content in the water of a coastal wetland in the Mar Menor lagoon (SE Spain): relationships with effluents from urban and agricultural areas. *Water, Air and Soil Pollution*, 173: 21–38.

- Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F.J., Roca, M.J., Ortiz, R. 2007. Changes in soils and vegetation in a Mediterranean coastal salt marsh impacted by human activities. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73: 510–526.
- Álvarez-Rogel, J., Ortiz, R., Vela de Oro, N., Alcaraz, F. 2001. The application of the FAO and US Soil Taxonomy systems to saline soils in relation to halophytic vegetation in SE Spain. *Catena*, 45: 73–84.
- AOAC, 1975. Official Methods of Analysis, 12th ed. AOAC International, Arlington, VA, EEUU.
- Arce, M.I., Sánchez-Montoya, M.M., Gómez, R. 2015. Nitrogen processing following experimental sediment rewetting in isolated pools in an agricultural stream of a semiarid region. *Ecological Engineering*, 77: 233–241.
- Bates, R.G. 1973. Determination of pH, theory and practice. John Wiley, New York, EEUU. 479 pp.
- Bollman, A., Conrad, R. 1997. Acetylene techniques lead to underestimation of denitrification rates in oxic soils due to scavenging of intermediate nitric oxide. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 1067–1077.
- Bower, C.A., Reitemeier, R.F., Fireman, M. 1952. Exchangeable cation analysis of saline and alkali soils. *Soil Science*, 73: 251–261.
- Chen, C., Whalen, J.K., Guo, X. 2014. Earthworms reduce soil nitrous oxide emissions during drying and rewetting cycles. *Soil Biology and Biochemistry*, 68: 117–124.
- Emil, R. 2000. Potentially mobile phosphorus in Lake Erken sediment. *Water Research*, 34: 2037–2042.

- Felber, R., Conen, F., Flechard, C.R., Neftel, A. 2012. Theoretical and practical limitations of the acetylene inhibition technique to determine total denitrification losses. *Biogeosciences*, 9: 4125–4138.
- González-Alcaraz, M. N., Egea, C., Jiménez-Cárceles, F. J., Párraga, I., María-Cervantes, A., Delgado, M. J., Álvarez-Rogel, J. 2012. Storage of organic carbon, nitrogen and phosphorus in the soil-plant system of *Phragmites australis* stands from an eutrophicated Mediterranean salt marsh. *Geoderma*, 158–186: 61–72.
- Groffman, P.M., Altabet, M.A., Böhlke, J.K., Butterbach-Bahl, K., David, M.B., Firestone, M.K., Giblin, A.E., Kana, T.M., Nielsen, L.P., Voytek, M.A. 2006. Methods for measuring denitrification: Diverse approaches to a difficult problem. *Ecological Applications*, 16: 2091–2122.
- Groffman, P.M., Holland, E.A., Myrold, D.D., Robertson, G.P., Zou, X. 1999. Denitrificación. En: Robertson, G.P., Coleman, D.C., Bledsoe, C.S., Sollins, P. (Eds.), Standard soil methods for long-term ecological research. Oxford University Press, New York, EEUU. pp. 272–288.
- Holmboe, N., Kristensen, E., Andersen, F.O. 2001. Anoxic decomposition in sediments from a tropical mangrove forest and the temperate Wadden Sea: implications of N and P addition experiments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 53: 125–140.
- Hulseman, J. 1996. An inventory of marine carbonate materials. *Journal of Sedimentary Petrology ASCE*, 36: 622–625.
- Jensen H.S., Thamdrup, B. 1993. Iron-bound phosphorus in marine sediments as measured by bicarbonate-dithionite extraction. *Hydrobiology*, 253: 47–59.

- Jiménez-Cárceles F.J., Álvarez-Rogel, J. 2008. Phosphorus fractionation and distribution in salt marsh soils affected by mine wastes and eutrophicated water: A case study in SE Spain. *Geoderma*, 144: 299–309.
- Karma, A. 1993. Chemical properties of organic soils. En: Carter, M.R. (Ed.), Soil sampling and methods of analysis. Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers and CRC Press. pp. 459–471.
- Koroleff, F. 1983. Determination of phosphorus. En: Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. (Eds.), *Methods of Seawater Analysis*. 2nd ed. Verlag Chemie, pp. 125–132.
- Largeau, C. 2004. Refractory macromolecular fraction of soil organic matter: chemical composition, sources and relationship with the stable fraction. EUROSIL Meeting, Freiburg, Alemania. 184 pp.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659–668.
- McKnight, D.M., Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T., Anderson, D.T. 2001. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology Oceanography*, 1: 38–48.
- Muller, G., Gatsner, M. 1971. Chemical analysis. *Neues Jahrbuch für Mineralogie Monatshefte*, 10: 466–469.
- Murphy, J., Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chemical Acta*, 42: 1011–1026.
- NEIKER. 2005. Determinación del contenido de amonio en aguas, lixiviados y extractos. PEC/EN/A–059.

- Paludan, C., Jensen, H.S. 1995. Sequential extraction of phosphorus in freshwater wetland and lake sediments: significance of humic acids. *Wetlands*, 15: 365–373.
- Paludan, C., Morris, J.T. 1999. Distribution and speciation of phosphorus along a salinity gradient in intertidal marsh sediments. *Biogeochemistry*, 45: 197–221.
- Pérez-Tortosa, V., López-Orenes, A., Martínez-Pérez, A., Ferrer M.A., Calderón, A.A. 2012. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, 130: 362–369.
- Qin, S., Hu, C., Oenema, O. 2012. Quantifying the underestimation of soil denitrification potential as determined by the acetylene inhibition method. *Soil Biology and Biochemistry*, 47: 14–17.
- Reddy, K.R., Kadlec, R.H., Flaig, E., Gale, P.M. 1999. Phosphorus retention in streams and wetlands: a review. *Environmental Science and Technology*, 29: 83–146.
- Rudolph, J., Frenzel, P., Pfennig, N. 1991. Acetylene inhibition technique underestimates in situ denitrification rates in intact cores of freshwater sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 85: 101–106.
- Schlichting, A., Leinweber, P., Meissner, R., Altermann, M. 2002. Sequentially extracted phosphorus fractions in peat-derived soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165: 290–298.
- SPSS. 2008. SPSS 17.0 para Windows Software. SPSS Inc., EEUU.
- Terry, R.E., Duxbury, J.M. 1985. Acetylene decomposition in soils. *Soil Science Society of America Journal*, 49: 90–94.

- Theriot, J.M., Conkle, J.L., Pezeshki, S.R., DeLaune, R.D., White, J.R. 2013. Will hydrologic restoration of Mississippi River riparian wetlands improve their critical biogeochemical functions?. *Ecological Engineering*, 60: 192–198.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D. 1987. An extraction method for measuring microbial biomass carbon. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 703–707.
- Vepraskas, M.J., Faulkner, S.P. 2001. Redox chemistry of hydric soils. En: Richardson, J.L., Vepraskas, M.J. (Eds.), *Wetland Soils. Genesis, Hydrology, Landscape and Classification*. Lewis Publishers, Florida, EEUU. pp. 85–106.
- Wang, J., Chen, Z., Ma, Y., Sun, L., Xiong, Z., Huang, Q., Sheng, Q. 2013. Methane and nitrous oxide emissions as affected by organic–inorganic mixed fertilizer from a rice paddy in southeast China. *Journal of Soils and Sediments*, 13: 1408–1417.
- Weishaar, J.L., Aiken, G.R., Bergamaschi, B.A., Fram, M.S., Fujij, R., Mopper, K. 2003. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environmental Science and Technology*, 37: 4702–4708.
- Wilhelm, E., Battino, R., Wilcock, R.J. 1977. Low–pressure solubility of gases in liquid water. *Chemical Reviews*, 77: 219–262.
- Willard, H.H., Merrit, L.L., Dean, J.A. 1974. *Instrumental methods of analysis*. 5th edition. Van Nostrand, New York, EEUU.

PARTE II

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 5

Comportamiento biogeoquímico del suelo

Response of biogeochemical processes of the water–soil–plant system to experimental flooding–drying conditions in a eutrophic wetland: the role of *Phragmites australis*.

(Respuesta de los procesos biogeoquímicos del sistema suelo–agua–planta a condiciones experimentales de inundación–secado en un humedal eutrofizado: papel de *Phragmites australis*).

Tercero, M.C., Álvarez-Rogel, J., Conesa, H.M., Ferrer, M.A., Calderón, A.A., López-Orenes, A., González-Alcaraz, M.N.

Plant and Soil 396 (2015), 109–125. DOI 10.1007/s11104-015-2589-z.

RESUMEN

El objetivo específico de esta parte del trabajo fue evaluar el papel de *Phragmites australis* en la variabilidad temporal de las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo relacionadas con los procesos biogeoquímicos en humedales eutrofizados. Para ello, se realizó un experimento en mesocosmos, con alternancia de las condiciones de inundación-secado, con agua eutrofizada con dos cargas de nutrientes. Durante 44 semanas se midieron en el suelo el Eh, pH, temperatura, emisiones de CO₂, carbono orgánico disuelto y carbono de la biomasa microbiana, y la actividad fisiológica de las plantas de *Phragmites*. En la superficie del suelo, el Eh disminuyó durante las fases de inundación y aumentó en los secados, independientemente de la presencia de plantas y de la concentración de nutrientes en el agua de inundación. En profundidad, *Phragmites* mantuvo condiciones óxicas. Durante los meses más cálidos, la difusión de O₂ promovida por las plantas de *Phragmites* obstaculizó la bajada del pH del suelo. La respiración microbiana del suelo se estimuló durante los meses más cálidos (temperatura del suelo ≈20–30 °C), como se muestra por las mayores emisiones de CO₂ y la mayor aromaticidad y contenido en compuestos fenólicos en el agua de poro del suelo. Esto último ocurrió independientemente de la presencia de plantas y de la concentración de nutrientes del agua de inundación, aunque la combinación de ambos factores favoreció una mayor población microbiana edáfica (mostrada por concentraciones más altas de carbono de la biomasa microbiana del suelo). Por lo tanto, la presencia de *Phragmites* y la concentración de nutrientes del agua de inundación tuvieron un papel diferente en la evolución temporal de las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo en humedales eutrofizados, y este papel estuvo fuertemente marcado por la profundidad del suelo y la temperatura.

Palabras clave: Potencial redox; Rizosfera; Eutrofización; Variabilidad temporal; Humedal.

5.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO ESPECÍFICO

La eutrofización es uno de los principales problemas medioambientales en todo el mundo. La necesidad de aumentar la producción en base a los requerimientos socio-económicos conduce, en ocasiones, a un incremento en el uso de agua y de fertilizantes, lo que puede acarrear un aumento de los excedentes de agua enriquecida en nutrientes (Goulding, 2000). Las áreas topográficamente deprimidas, como los humedales costeros, son propensas a recibir estas aguas eutrofizadas, lo que a su vez puede modificar el equilibrio de los nutrientes y las condiciones biogeoquímicas del suelo, disminuyendo la calidad del medio ambiente (Smith *et al.*, 1999). En particular, en zonas áridas y semiáridas, las fluctuaciones en las condiciones hidrológicas están vinculadas a menudo con las variaciones de los efluentes agrícolas a lo largo de todo el año y, por lo tanto, con los cambios en los aportes de nutrientes (Sánchez-Carrillo y Álvarez-Cobelas, 2001; Álvarez-Rogel *et al.*, 2006; González-Alcaraz *et al.*, 2012). En este escenario, los humedales naturales están siendo cada vez más valorados debido a su papel como filtros verdes (Mitsch y Gosselink, 2007). En muchos casos, su capacidad para mejorar la calidad del agua se ve aumentada por la construcción de sistemas artificiales (Vymazal, 2007; Saeed y Sun, 2012). Las prácticas comunes de gestión incluyen el manejo de la vegetación (por ejemplo, la recolección de las plantas) y de los sistemas de interceptación de drenajes agrícolas (por ejemplo, la interceptación de lixiviados cargados en nutrientes), y el desarrollo de sistemas integrales compuestos por humedales naturales y artificiales (Mitsch *et al.*, 2001; Thullen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2011). Por todo ello, una comprensión más adecuada de los procesos biogeoquímicos que ocurren en el sistema suelo-agua-planta de los humedales es crucial para mejorar el conocimiento sobre su funcionamiento y manejo. En este sentido, el potencial redox (Eh) y el pH son parámetros clave, debido a que la combinación Eh-pH tiene una fuerte influencia en la biogeoquímica de estos sistemas (Reddy y DeLaune, 2008).

Como se ha mencionado en capítulos anteriores (capítulo 1), el Eh refleja la actividad de los microorganismos del suelo (Fiedler *et al.*, 2007). La intensidad de los cambios del Eh depende de una serie de factores tales como la disponibilidad de

materia orgánica y nutrientes, la temperatura, la presencia de plantas, etc. (Fiedler *et al.*, 2007; Reddy y DeLaune, 2008). En este sentido, las concentraciones elevadas de nitrógeno (N), fósforo (P) y materia orgánica soluble, como las que se presentan en sistemas eutrofizados (Smith *et al.*, 1999), desempeñan un papel importante en el comportamiento del sistema Eh–pH. Por ejemplo, un aumento de las concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD) y nutrientes puede provocar un pico de actividad microbiana, conduciendo al agotamiento del oxígeno (O₂) y, por lo tanto, a una bajada de los valores del Eh, lo que podría acarrear un aumento del pH (Ponnamperuma *et al.*, 1966; Stumm y Sulzberger, 1992).

A diferencia de los cambios espaciales del Eh y pH, la variabilidad temporal de estos dos parámetros ha sido escasamente documentada, sobre todo durante largos períodos de tiempo (superiores a unas horas o días). El estudio de largas escalas temporales es difícil, dada la naturaleza dinámica de los factores implicados en la biogeoquímica del suelo, y requiere de una monitorización detallada *in situ*. Además, los perfiles edáficos suelen mostrar una estratificación heterogénea, con diferentes características físicas y/o químicas a distintas profundidades, en particular en zonas topográficamente deprimidas como son los humedales, debido a los diferentes eventos de sedimentación (Reddy y DeLaune, 2008). Las relaciones entre los cambios que se producen en el entorno de la rizosfera y el comportamiento de las plantas correspondientes, a diferentes profundidades, son aspectos clave para entender los procesos biogeoquímicos en el sistema suelo–agua–planta, pero también para aumentar las opciones de manejo de estos sistemas en nuestro beneficio. El interés de este conocimiento debe enmarcarse además en el contexto del cambio climático (Philippot *et al.*, 2009), más aún bajo condiciones desfavorables como las de sistemas eutrofizados.

El objetivo específico de esta parte del trabajo fue evaluar el papel de *Phragmites australis* en la variabilidad temporal de las propiedades físico–químicas y microbiológicas del suelo en humedales eutrofizados. Para ello, en el experimento realizado en mesocosmos, con alternancia de las condiciones de inundación–secado durante 44 semanas, se monitorizaron diversos parámetros del suelo así como la

actividad fisiológica de las plantas de *Phragmites* (ver capítulo 4). Las hipótesis iniciales fueron que: 1) las propiedades del suelo con influencia en los procesos biogeoquímicos podrían presentar una dinámica temporal debido a que están afectadas por cambios en factores tales como la humedad del suelo y la temperatura; 2) esta dinámica cambiaría en diferentes horizontes del suelo, y podría estar alterada tanto por la presencia de la rizosfera de *Phragmites* como por el agua eutrofizada; 3) el estado fisiológico de *Phragmites* podría cambiar con el tiempo debido a variaciones en las condiciones de temperatura y de humedad del suelo; 4) la influencia de *Phragmites* en el suelo rizosférico podría cambiar a lo largo del período experimental en respuesta a cambios en factores tales como la temperatura y la humedad del suelo.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente capítulo recoge los resultados relacionados con la evolución de la temperatura y humedad ambiental en el interior del invernadero; Eh, pH, temperatura y carbono de la biomasa microbiana (CBM) del suelo; emisión de dióxido de carbono (CO₂) a la atmósfera procedente del suelo; concentración de COD, compuestos fenólicos solubles totales (Phe), aromaticidad (SUVA₂₅₄) e índice de fluorescencia (IF) en las muestras de agua de poro; estado fisiológico de las plantas de *Phragmites* determinado por las medidas de la tasa de fotosíntesis neta (Pn) y extinción fotoquímica (qP). Para una descripción detallada de la metodología seguida ver capítulo 4.

En cuanto al análisis estadístico de los datos, para cada horizonte del suelo (superficial y subsuperficial) y tratamiento ensayado (sin planta + baja carga de nutrientes; sin planta + alta carga de nutrientes; *Phragmites* + baja carga de nutrientes; *Phragmites* + alta carga de nutrientes), la relación entre las diversas variables se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Para cada horizonte del suelo, y con el fin de comparar la evolución de las distintas variables a lo largo del tiempo y entre los diferentes tratamientos ensayados, se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas (ANOVA-MR). Los factores incluidos en el análisis fueron: (1) factor inter-sujetos, tratamiento, con cuatro niveles, y (2) factor intra-sujetos, tiempo (factor

con medidas repetidas), con tantos niveles como muestreos realizados (por ejemplo, para pH y Eh $n = 49$; para COD $n = 39$; para IF $n = 21$; ver Tabla 4.3 del capítulo 4). Las variables dependientes incluidas en el análisis fueron los parámetros analizados a lo largo del experimento en el suelo (Eh, pH, T, CBM), en la solución del suelo (CE, COD, SUVA₂₅₄, Phe, IF), gases (CO₂) y material vegetal (Pn, qP). Cuando los datos no cumplían el requerimiento de esfericidad de acuerdo al test de esfericidad de Maulchly, se optó por utilizar el estadístico F univariado aplicando el índice corrector épsilon en base a las estimaciones de Greenhouse–Geisser, Huynh–Feldt y límite inferior (SPSS Inc, 2006). Un efecto significativo del tiempo indica que los cambios de una variable dependiente, es decir la dinámica, fueron significativos a lo largo del experimento, independientemente del tratamiento ensayado. Un efecto significativo de la interacción tiempo x tratamiento indica que la evolución de una variable dependiente a lo largo del tiempo fue diferente entre tratamientos. Un efecto significativo del tratamiento indica que los valores medios de una variable dependiente fueron diferentes entre los tratamientos ensayados. Cuando el tratamiento fue un factor significativo, se realizaron comparaciones post–hoc con el test de Bonferroni para identificar diferencias entre grupos.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. CAMBIOS DE POTENCIAL REDOX (Eh), pH Y TEMPERATURA

El Eh se comportó de manera diferente en los horizontes superficiales y subsuperficiales del suelo (Figura 5.1).

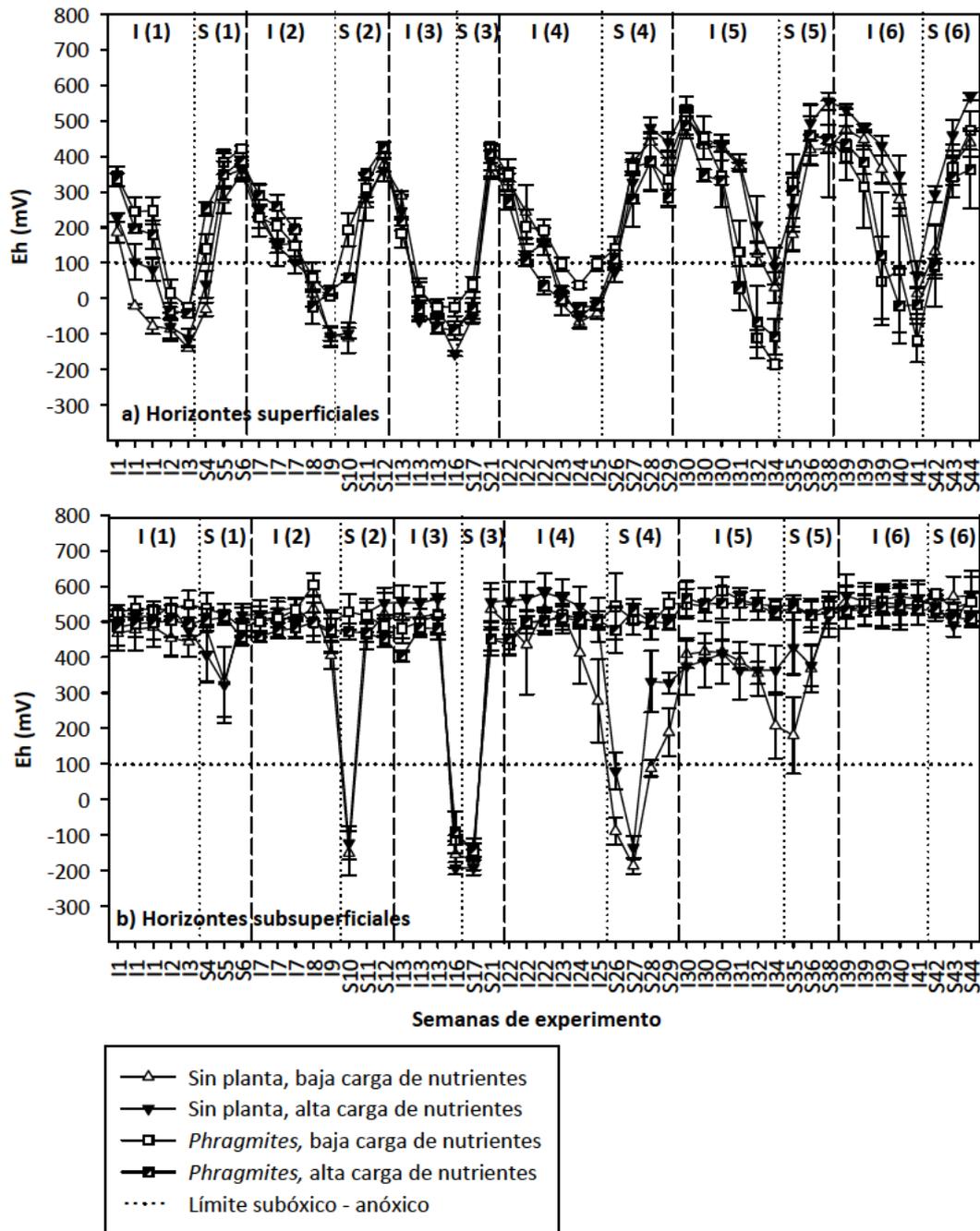


Figura 5.1. Evolución del potencial redox (Eh) durante el experimento en el horizonte superficial (a) y subsuperficial (b) del suelo. Los valores son la media \pm error estándar ($n = 3$). Se designa con I a las semanas de inundación y con S a las de secado. En la parte superior del gráfico, el número entre paréntesis después de I o S indica la fase de inundación o de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I22 fue la semana 22 del experimento, perteneciente a la cuarta fase de inundación –I(4)–; S35 fue la semana 35 del experimento, perteneciente a la quinta fase de secado –S(5)–). Durante la primera semana de cada fase de inundación se tomaron datos durante tres días alternos (ver Tabla 4.3 del capítulo 4).

En los horizontes superficiales (Figura 5.1a), el ANOVA–MR indicó que el Eh evolucionó de forma significativa a lo largo del experimento (efecto del tiempo, $p <$

0,001; Tabla 5.1), independientemente de los tratamientos ensayados. Los valores del Eh disminuyeron durante las fases de inundación (mínimo ≈ -200 mV en la semana I34) y aumentaron en las de secado (hasta $> +400$ mV), independientemente de la presencia de *Phragmites* y el tipo de agua (efecto no significativo del tratamiento y de la interacción tiempo x tratamiento; Tabla 5.1). En los horizontes subsuperficiales arenosos (Figura 5.1b), la evolución del Eh a lo largo del experimento fue igualmente significativa (efecto del tiempo, $p < 0,001$; Tabla 5.1). En este caso, la evolución del Eh se vio afectada significativamente por el tratamiento ($p = 0,007$; Tabla 5.1), mostrando los tratamientos con *Phragmites* valores más altos de Eh. Además, la interacción tiempo x tratamiento fue significativa ($p = 0,028$; Tabla 5.1), lo que indicó que no todos los tratamientos ensayados evolucionaron de la misma manera. En los tratamientos sin plantas, los valores del Eh disminuyeron al final de las fases de inundación e inicio de los secados (mínimo ≈ -200 mV en las semanas I16–S17) a excepción del intervalo de tiempo entre las semanas I41–S42. Por el contrario, en los tratamientos con *Phragmites*, el Eh apenas varió (valor medio $\approx +500$ mV), excepto durante las semanas I16–S17 en las que disminuyó a valores similares a los tratamientos sin plantas.

Los cambios temporales de pH a lo largo del experimento (Figura 5.2) fueron significativos tanto para los horizontes superficiales del suelo como los subsuperficiales (efecto del tiempo, $p \leq 0,025$; Tabla 5.1). En ambos casos, la interacción tiempo x tratamiento fue significativa ($p \leq 0,015$; Tabla 5.1), indicando que los cambios de pH en el tiempo fueron diferentes para los distintos tratamientos ensayados. En ausencia de plantas, los valores de pH en los horizontes superficiales (Figura 5.2a) fueron claramente más elevados que en los horizontes subsuperficiales (Figura 5.2b), mientras que esta diferencia no fue tan evidente para los tratamientos con *Phragmites*. Además, estaba claro que había dos periodos en la evolución del pH: un primer periodo (entre las semanas I1 y S21) en el que los valores del pH aumentaron durante los secados y disminuyeron progresivamente durante las fases de inundación en ambos horizontes del suelo, y un segundo periodo (entre las semanas I22 y S44) en el que las oscilaciones de pH fueron menos pronunciadas.

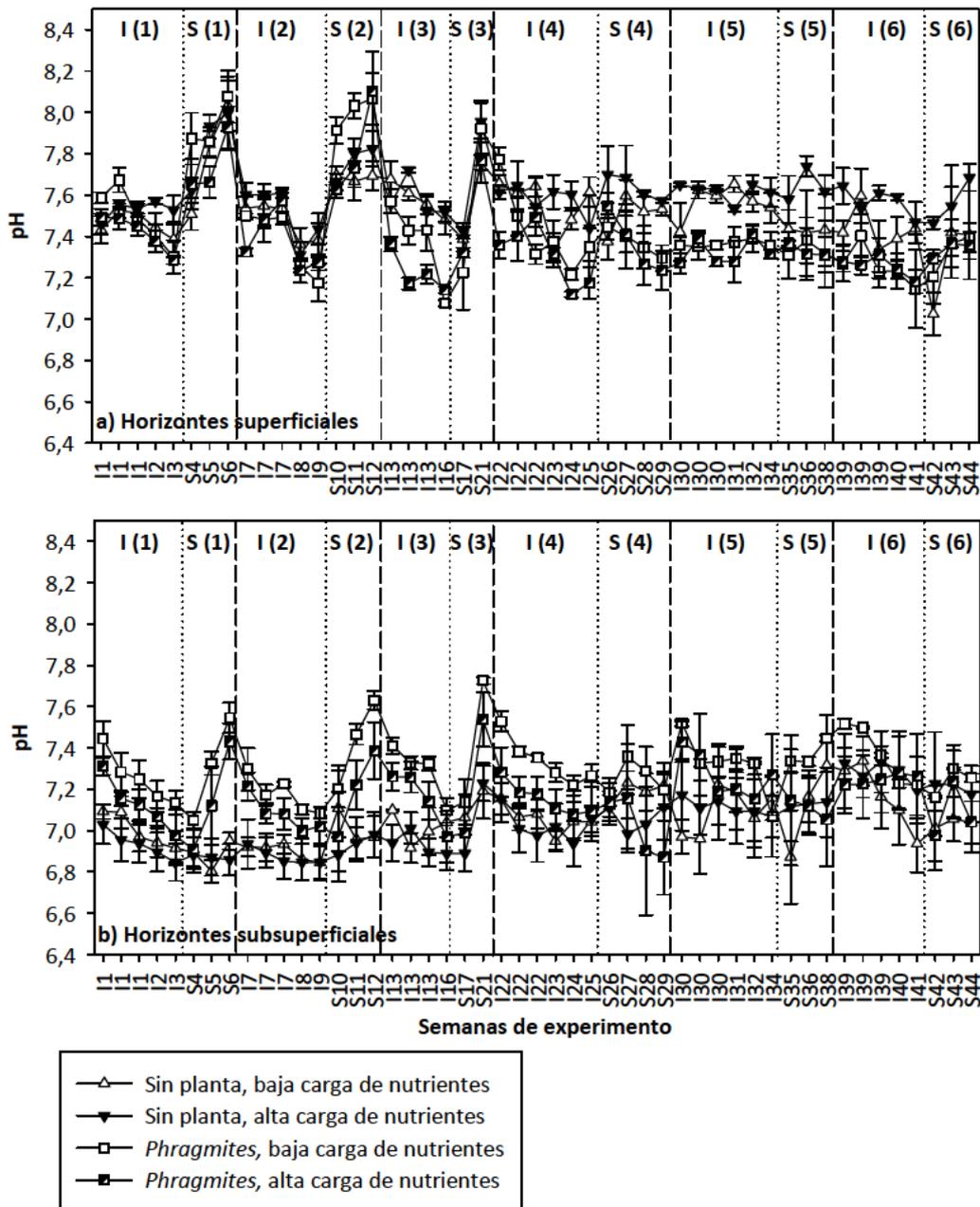


Figura 5.2. Evolución del pH durante el experimento en el horizonte superficial (a) y subsuperficial (b) del suelo. Los valores son la media \pm error estándar ($n = 3$). Se designa con I a las semanas de inundación y con S a las de secado. En la parte superior del gráfico, el número entre paréntesis después de I o S indica la fase de inundación o de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I22 fue la semana 22 del experimento, perteneciente a la cuarta fase de inundación –I(4)–; S35 fue la semana 35 del experimento, perteneciente a la quinta fase de secado –S(5)–). Durante la primera semana de cada fase de inundación se tomaron datos durante tres días alternos (ver Tabla 4.3 del capítulo 4).

Cuando el ANOVA–MR se aplicó por separado a los datos del pH de ambos periodos, los resultados fueron diferentes para los horizontes superficiales y subsuperficiales (Tabla 5.1). En las primeras 21 semanas del experimento (entre las

semanas I1 y S21), el efecto del tiempo fue significativo en ambas profundidades ($p < 0,001$; Tabla 5.1). La interacción tiempo \times tratamiento sólo fue significativa en el horizonte subsuperficial ($p = 0,010$; Tabla 5.1), mostrando el tratamiento sin planta + alta carga de nutrientes valores de pH significativamente más bajos que el tratamiento *Phragmites* + baja carga de nutrientes (efecto del tratamiento, $p = 0,017$, Tabla 5.1). En el segundo período (entre las semanas I22 y S44), el pH también evolucionó significativamente en el tiempo a ambas profundidades (efecto del tiempo, $p \leq 0,008$; Tabla 5.1), pero sin efecto significativo de la interacción tiempo \times tratamiento ni en el horizonte superficial ni en el subsuperficial. En este segundo período, el tratamiento sin planta + alta carga de nutrientes mostró un pH significativamente más alto que el tratamiento *Phragmites* + alta carga de nutrientes en el horizonte superficial (efecto del tratamiento, $p = 0,015$; Tabla 5.1). Sin embargo, no hubo diferencias entre tratamientos en el horizonte subsuperficial.

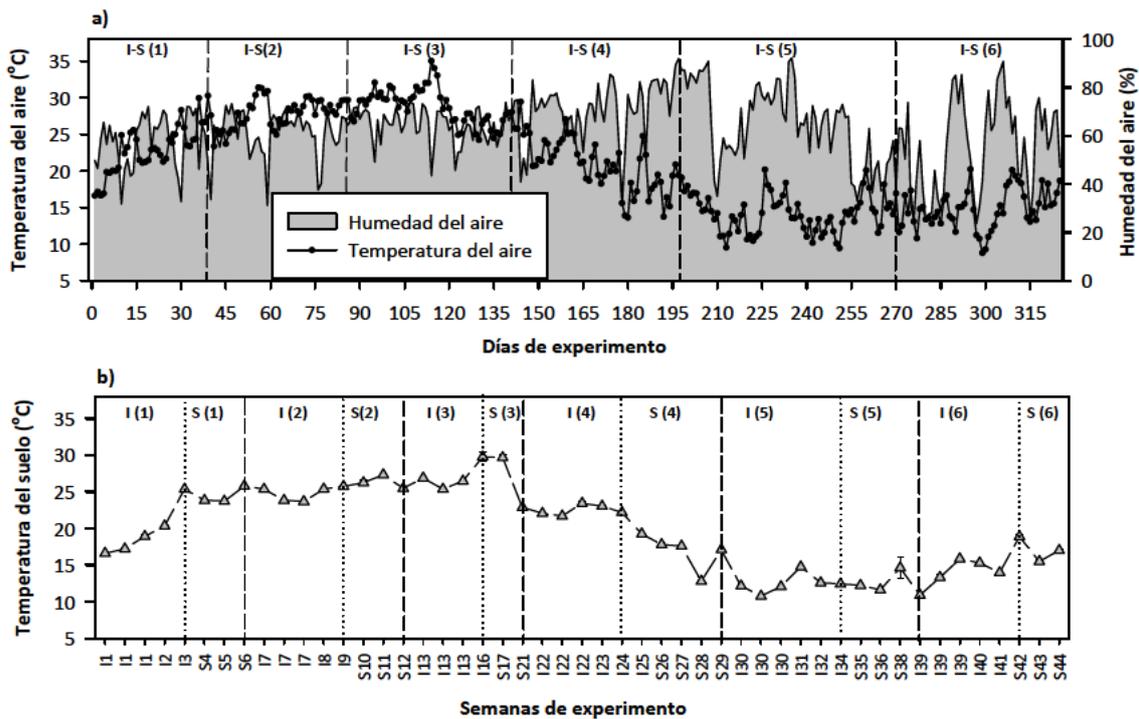


Figura 5.3. a. Evolución de la media de temperatura diaria y de humedad del aire en el interior del invernadero durante el experimento. b. Evolución de la temperatura del suelo (de los ≈ 5 cm superficiales) durante el experimento (los valores son las medias \pm error estándar, $n = 12$). Se designa con I a las semanas de inundación y con S a las de secado. En la parte superior del gráfico, los números entre paréntesis después de I o S indican la fase de inundación o de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I22 se refiere a la semana 22 del experimento, que se corresponde con la cuarta fase de inundación –I(4)–; S35 se refiere a la semana 35 del experimento, que corresponde la quinta fase de secado –S(5)–). Durante la primera semana de inundación se tomaban datos durante tres días alternos (ver Tabla 4.3 del capítulo 4).

Los valores de temperatura del aire más altos se produjeron durante el tercer ciclo de inundación–secado (días 90–145, semanas I13–S21), disminuyendo a partir del día 150 (semana I22) en adelante, coincidiendo con un aumento de la humedad del aire (Figura 5.3a). La temperatura del suelo fue muy similar entre los diferentes tratamientos ensayados (rango de variación < 0,1 °C) y por tanto los datos de los distintos mesocosmos se agruparon conjuntamente (Figura 5.3b). La temperatura del suelo se incrementó progresivamente de ≈17 °C en la semana I1 a ≈30 °C en la semana I16 y disminuyó hasta alcanzar ≈10 °C en la semana I30. Entre las semanas I39 y S44 la temperatura del suelo tendió a aumentar hasta ≈17–20 °C en las últimas dos semanas del experimento.

5.3.2. CAMBIOS DE CARBONO ORGÁNICO DISUELTO (COD), DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) Y CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA (CBM)

La concentración de COD (Figura 5.4) evolucionó de forma significativa a lo largo del experimento en ambos horizontes del suelo (efecto del tiempo, $p < 0,001$; Tabla 5.1). En el horizonte superficial (Figura 5.4a), los cambios temporales no se vieron afectados por los distintos tratamientos ensayados (efecto no significativo del tratamiento y de la interacción tiempo x tratamiento; Tabla 5.1). Sin embargo, en el horizonte subsuperficial (Figura 5.4b), los tratamientos mostraron una evolución diferente (efecto significativo de la interacción tiempo x tratamiento, $p = 0,012$; Tabla 5.1), y el tratamiento *Phragmites* + alta carga de nutrientes mostró concentraciones de COD significativamente más elevadas que el tratamiento sin planta + baja carga de nutrientes (efecto del tratamiento, $p = 0,029$; Tabla 5.1). Las mayores oscilaciones en la concentración de COD tuvieron lugar entre las semanas I1 y S21. En estas primeras 21 semanas del experimento, los resultados del ANOVA–MR fueron similares a los obtenidos cuando se analizaron conjuntamente los datos de las 44 semanas experimentales (Tabla 5.1). Sin embargo, entre las semanas I22 e I25 se observó un aumento progresivo de las concentraciones de COD, seguido de una caída hasta la semana I30 y una cierta estabilización entre esta semana y el final del experimento. Cuando el ANOVA–MR se aplicó a los datos de este segundo periodo, la evolución temporal fue igualmente significativa para ambos horizontes (efecto del tiempo, $p \leq$

0,006; Tabla 5.1), pero sin diferencias entre tratamientos (efecto no significativo del tratamiento y de la interacción tiempo x tratamiento; Tabla 5.1).

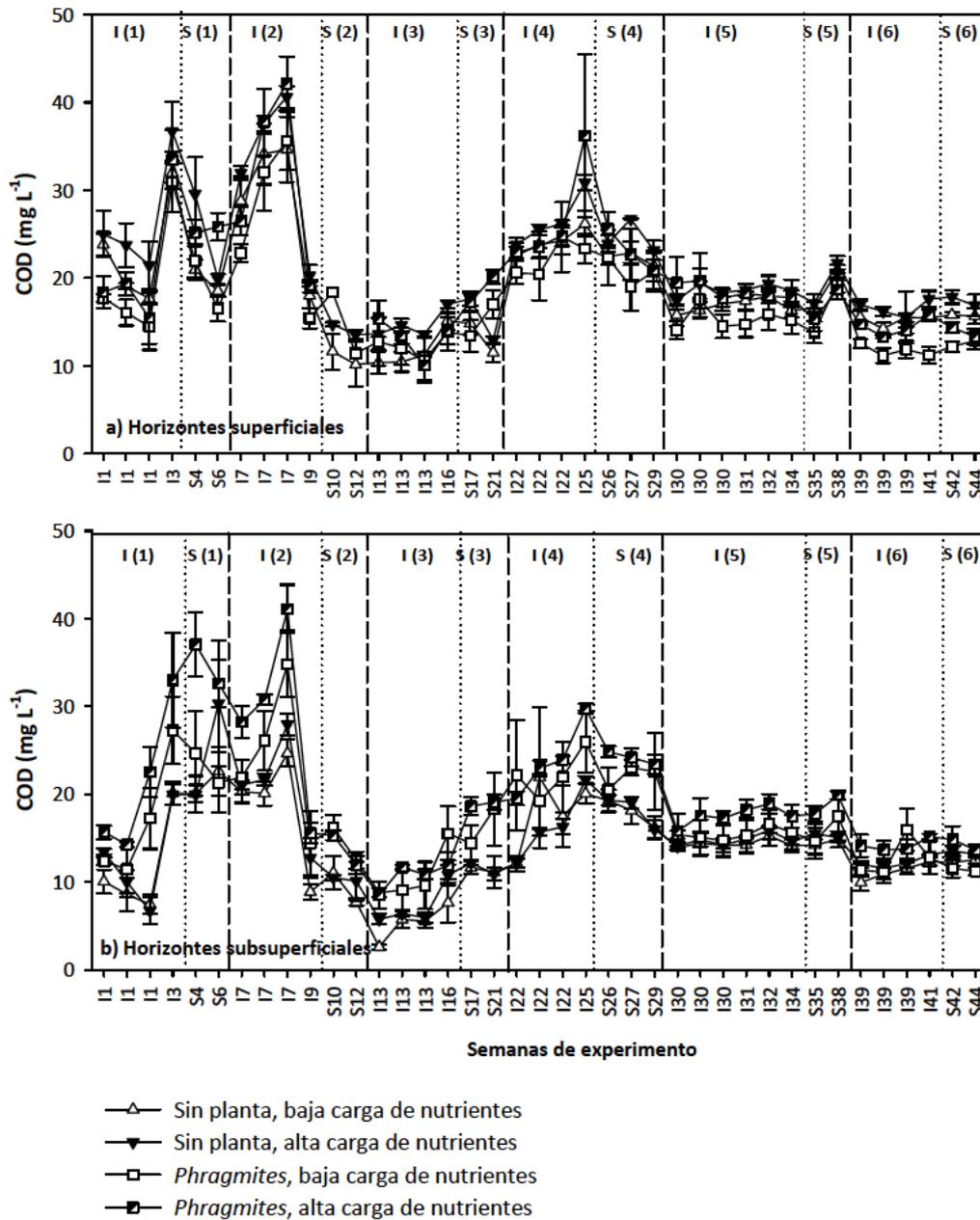


Figura 5.4. Evolución de la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) en el agua de poro durante el experimento en los horizontes superficiales (a) y subsuperficiales (b) del suelo. Los valores son la media \pm error estándar ($n = 3$). Se designa con I a las semanas de inundación y con S a las de secado. En la parte superior del gráfico, el número entre paréntesis después de I o S indica la fase de inundación o de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I22 fue la semana 22 del experimento, perteneciente a la cuarta fase de inundación –I(4)–; S35 fue la semana 35 del experimento, perteneciente a la quinta fase de secado –S(5)–). Durante la primera semana de cada fase de inundación se tomaron muestras durante tres días alternos (ver Tabla 4.3 del capítulo 4).

Con respecto a los parámetros relacionados con la naturaleza del COD del agua de poro (Figura 5.5), la evolución temporal a lo largo del experimento de la $SUVA_{254}$ (Figura 5.5a), Phe (Figura 5.5b) e IF en el horizonte superficial del suelo (Figura 5.5c) mostró dos periodos con diferente comportamiento: las mayores oscilaciones temporales ocurrieron en los tres primeros ciclos de inundación–secado (semanas I3 a S21) y las menores en los dos últimos (semanas I30 a S44), con una estabilización de las medidas. Los tres parámetros cambiaron significativamente en el tiempo (efecto del tiempo, $p < 0,001$; Tabla 5.1), tanto considerando el total de las 44 semanas experimentales como para cada uno de los dos periodos descritos anteriormente, pero sin diferencias entre tratamientos.

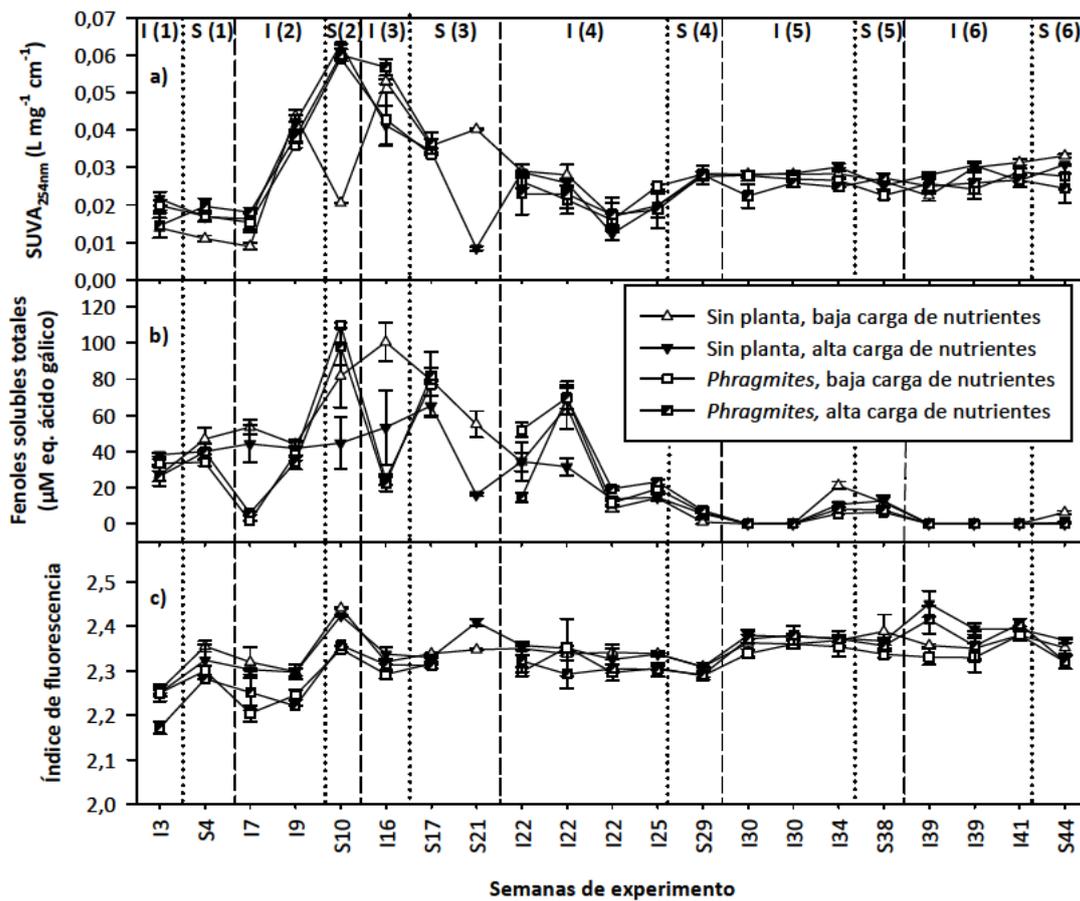


Figura 5.5. Evolución de la absorbancia ultravioleta (UV) específica a 254 nm ($SUVA_{254nm}$) (a), contenido de compuestos fenólicos solubles totales (Phe) (b), e índice de fluorescencia (IF) (c), en el agua de poro del horizonte superficial durante el experimento. Los valores son la media \pm error estándar ($n = 3$). Se designa con I a las semanas de inundación y con S a las de secado. En la parte superior del gráfico, los números entre paréntesis después de I o S indican la fase de inundación o de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I22 se refiere a la semana 22 del experimento, que se corresponde con la cuarta fase de inundación –I(4)–; S35 se refiere a la semana 35 del experimento, que corresponde a la quinta fase de secado –S(5)–).

Las tasas de emisión de CO₂ (Figura 5.6) cambiaron significativamente a lo largo del experimento (efecto del tiempo, $p < 0,001$; Tabla 5.1), mostrando los cuatro tratamientos ensayados una dinámica similar (efecto no significativo de la interacción tiempo x tratamiento). Las mayores emisiones de CO₂ se produjeron entre las semanas I1 y S21, con picos de emisión durante los secados. El tratamiento sin planta + baja carga de nutrientes mostró emisiones de CO₂ (valor medio $0,15 \pm 0,02 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) significativamente más bajas (efecto del tratamiento, $p = 0,032$; Tabla 5.1) que el tratamiento *Phragmites* + alta carga de nutrientes (valor medio $0,28 \pm 0,02 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$).

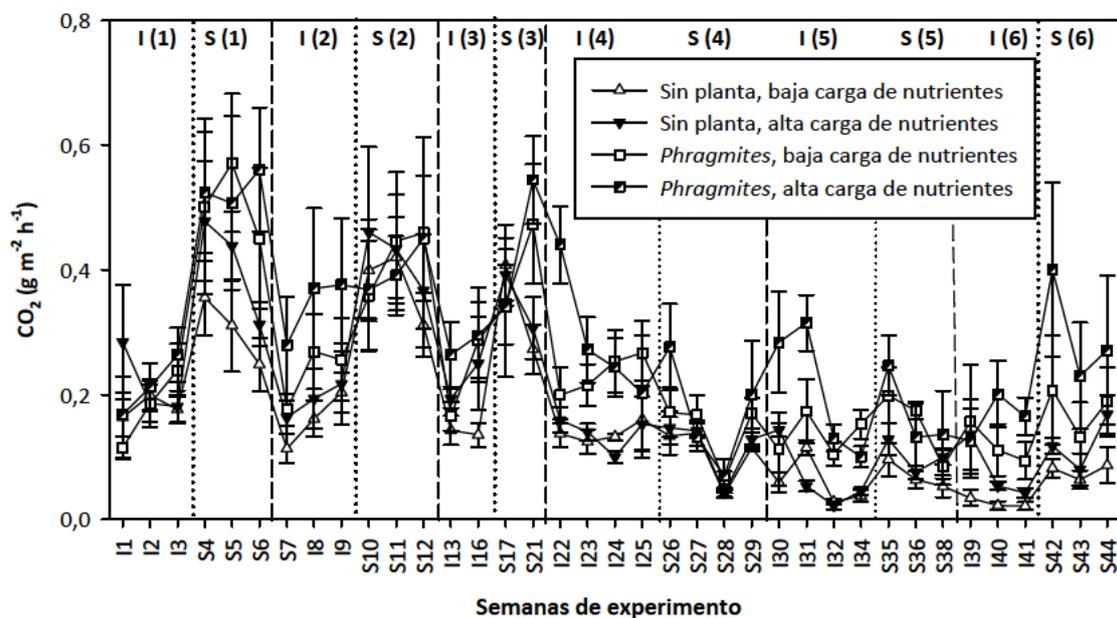


Figura 5.6. Evolución de las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) desde la superficie del suelo durante el experimento. Los valores son la media \pm error estándar ($n = 3$). Se designa con I a las semanas de inundación y con S a las de secado. En la parte superior del gráfico, los números entre paréntesis después de I o S indican la fase de inundación o de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I22 se refiere a la semana 22 del experimento, que se corresponde con la cuarta fase de inundación –I(4)–; S35 se refiere a la semana 35 del experimento, que corresponde a la quinta fase de secado –S(5)–).

En relación al CBM del suelo (Figura 5.7), cuando el ANOVA–MR se aplicó al conjunto de los datos de todo el experimento (semanas I1 a S44), no se encontraron efectos significativos del tiempo, tratamiento e interacción tiempo x tratamiento (Tabla 5.1). Sin embargo, entre las semanas I1 a S21, el CBM evolucionó de forma significativa en el tiempo (efecto del tiempo, $p = 0,019$; Tabla 5.1), mostrando el tratamiento *Phragmites* + alta carga de nutrientes valores significativamente más altos

de CBM que los tratamientos sin plantas (efecto del tratamiento, $p = 0,030$; Tabla 5.1). Entre las semanas I22 a S44 no hubo ni evolución temporal ni efecto de los tratamientos en el CBM del suelo.

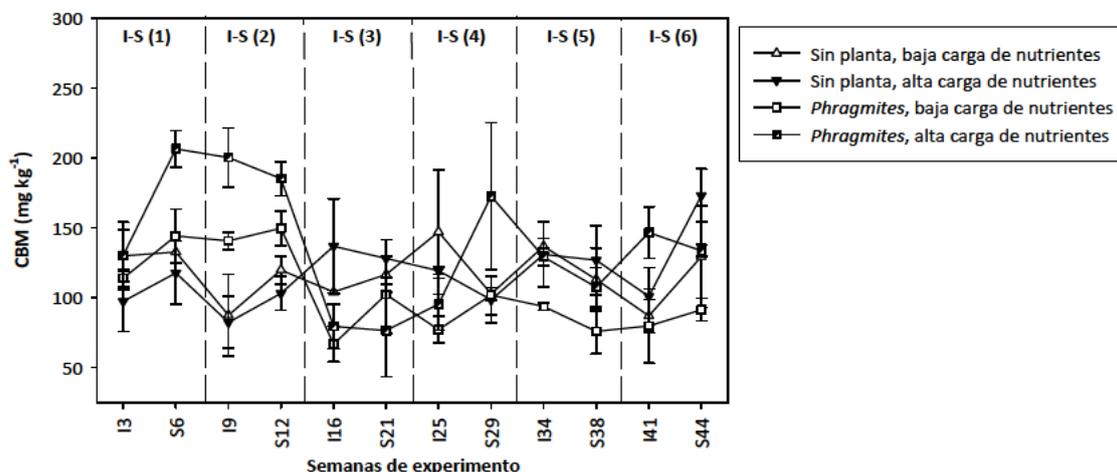


Figura 5.7. Evolución del carbono de la biomasa microbiana (CBM) en los horizontes superficiales del suelo durante el experimento. Los valores son la media \pm error estándar ($n = 3$). Se designa con I a las semanas de inundación y con S a las de secado. En la parte superior del gráfico, los números entre paréntesis después de I-S indican el ciclo de inundación-secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I9 se refiere a la semana 9 del experimento, perteneciente a la segunda fase de inundación –I(2)–; S29 se refiere a la semana 29 del experimento, perteneciente a la cuarta fase de secado –S(4)–).

5.3.3. CONDICIONES FISIOLÓGICAS DE *Phragmites australis*

La evolución de los parámetros relacionados con la fotosíntesis en *Phragmites* se muestra en la Figura 5.8. Las plantas de *Phragmites* no estuvieron activas a partir de la semana S27 (correspondiente al mes de noviembre), por tanto los datos sólo pudieron ser tomados hasta esa fecha. Los cambios en la tasa de fotosíntesis neta a lo largo del tiempo (Figura 5.8a) fueron significativos (efecto del tiempo, $p = 0,001$; Tabla 5.1), aunque no se vieron afectados por la carga de nutrientes en el agua de inundación (efecto no significativo del tratamiento). Sin embargo, la capacidad fotosintética de *Phragmites* fue ligeramente superior en el tratamiento con baja carga de nutrientes. Durante los dos primeros ciclos de inundación-secado (semanas I1–S12), la fotosíntesis neta tendió a aumentar en las fases de inundación (máximo $\approx 12,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ en la semana I3) y a disminuir durante los secados (mínimo $\approx 2,3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ en la

semana S6). Por el contrario, este comportamiento cambió entre las semanas I13–S27: se observó un incremento general de la tasa de fotosíntesis neta entre las semanas I13–S19 y una disminución a partir de la semana I22, coincidiendo con un marcado secado de las hojas de *Phragmites* (observación personal de los autores). El qP (Figura 5.8b) fue prácticamente constante entre las semanas I1–S19 y disminuyó fuertemente a partir de la semana I22 (efecto significativo del tiempo, $p = 0,001$; Tabla 5.1), pero sin efecto significativo del tratamiento y de la interacción tiempo x tratamiento.

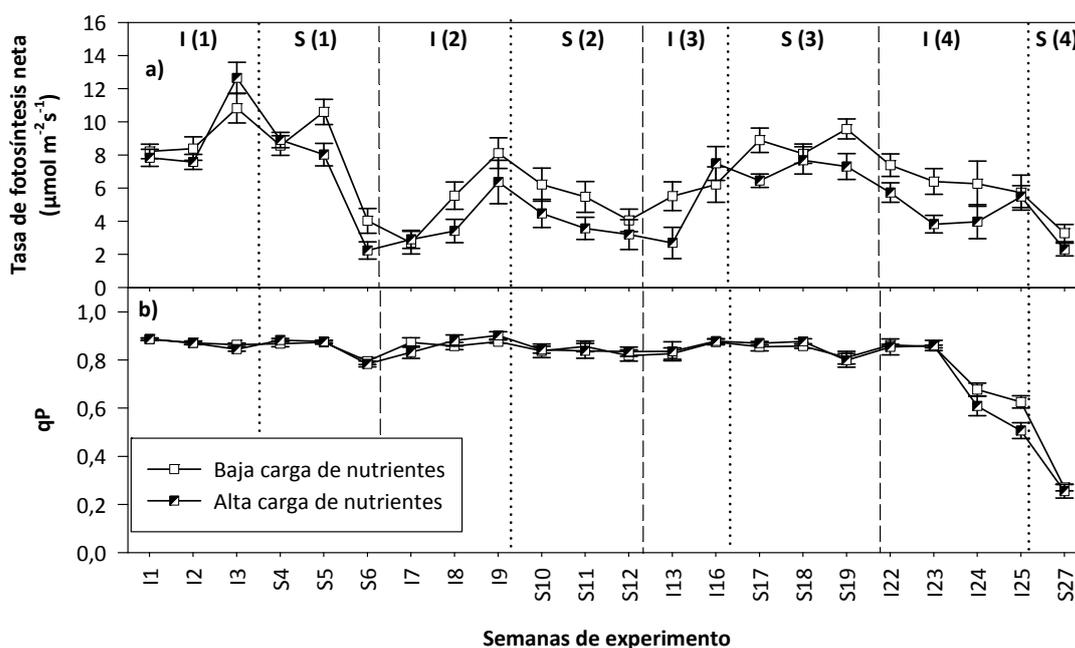


Figura 5.8. Evolución de la tasa de fotosíntesis neta (a) y la extinción fotoquímica (qP) (b) en las primeras hojas totalmente expandidas de *Phragmites australis* a lo largo del experimento. Los valores son la media \pm error estándar ($n = 3$). Se designa con I a las semanas de inundación y con S a las de secado. En la parte superior del gráfico, los números entre paréntesis después de I o S indican la fase de inundación o de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I9 se refiere a la semana 9 del experimento, que se corresponde con la segunda fase de inundación –I(2)–; S19 se refiere a la semana 19 del experimento, que se corresponde a la tercera fase de secado –S(3)–). Las plantas no estuvieron activas a partir de la semana S27, por lo tanto no se pudieron tomar datos entre las semanas S28–S44.

Tabla 5.1. Resultados (valores de p) del ANOVA de medidas repetidas (ANOVA–MR) y de las comparaciones post–hoc con el test de Bonferroni para las variables dependientes analizadas (a indica los valores más bajos y b los más altos). Los tratamientos fueron: SP+BC (Sin planta + baja carga de nutrientes), Ph+BC (*Phragmites* + baja carga de nutrientes), SP+AC (Sin planta + alta carga de nutrientes), y Ph+AC (*Phragmites* + alta carga de nutrientes). Entre paréntesis se indica el periodo de tiempo para cada análisis: I designa inundación y S secado; los números indican la semana del experimento. N: número total de semanas incluidas en el análisis. Eh: potencial redox; COD: carbono orgánico disuelto; SUVA₂₅₄: aromaticidad; Phe: compuestos fenólicos solubles totales; IF: índice de fluorescencia; CBM: carbono de la biomasa microbiana; CO₂: emisiones de dióxido de carbono; Pho: fotosíntesis; qP: extinción fotoquímica. T°: tiempo; Tto.: tratamiento. En negrita valores significativos.

Variable	N	Horizonte del suelo	ANOVA–MR			Test post–hoc			
			Tiempo	T° x Tto.	Tratamiento	SP + BC	Ph + BC	SP + AC	Ph + AC
Eh (I1–S44)	44	Superficial	0,000	0,095	0,482	a	a	a	a
	44	Subsuperficial	0,000	0,028	0,007	a	b	a	b
(I1–S21)	21	Superficial	0,000	0,000	0,010	a	b	a	b
	21	Subsuperficial	0,000	0,025	0,056	a	a	a	a
(I22–S44)	23	Superficial	0,001	0,248	0,109	a	a	a	a
	23	Subsuperficial	0,004	0,035	0,001	a	b	a	b
pH (I1–S44)	44	Superficial	0,003	0,015	0,018	ab	ab	b	a
	44	Subsuperficial	0,025	0,010	0,198	a	a	a	a
(I1–S21)	21	Superficial	0,000	0,104	0,083	a	a	a	a
	21	Subsuperficial	0,000	0,010	0,017	ab	b	a	ab
(I2–S44)	23	Superficial	0,008	0,269	0,015	ab	ab	b	a
	23	Subsuperficial	0,000	0,196	0,198	a	a	a	a
COD (I1–S44)	39	Superficial	0,000	0,305	0,137	a	a	a	a
	39	Subsuperficial	0,000	0,012	0,029	a	ab	ab	b
(I1–S21)	18	Superficial	0,000	0,282	0,214	a	a	a	a
	18	Subsuperficial	0,000	0,017	0,009	a	ab	ab	b
(I22–S44)	21	Superficial	0,006	0,398	0,060	a	a	a	a
	21	Subsuperficial	0,001	0,296	0,110	a	a	a	a
SUVA ₂₅₄ (I3–S44)	21	Superficial	0,000	0,214	0,197	a	a	a	a
(I3–S21)	8	Superficial	0,000	0,354	0,265	a	a	a	a
(I21–S44)	13	Superficial	0,020	0,451	0,112	a	a	a	a
Phe (I3–S44)	21	Superficial	0,000	0,001	0,056	a	a	a	a
(I3–S21)	8	Superficial	0,000	0,365	0,251	a	a	a	a
(I21–S44)	13	Superficial	0,004	0,223	0,721	a	a	a	a
IF (I3–S44)	21	Superficial	0,001	0,218	0,058	a	a	a	a
(I3–S21)	8	Superficial	0,000	0,123	0,556	a	a	a	a
(I21–S44)	13	Superficial	0,045	0,445	0,454	a	a	a	a
CBM (I3–S44)	12	Superficial	0,164	0,154	0,089	a	a	a	a
(I3–S21)	6	Superficial	0,019	0,030	0,013	a	ab	a	b
(I21–S44)	6	Superficial	0,156	0,254	0,437	a	a	a	a
CO ₂ (I1–S44)	37	Superficial	0,000	0,253	0,032	a	ab	ab	b
Pho (I1–S27)	22	<i>Phragmites</i>	0,001	0,322	0,425		a		a
qP (I1–S44)	22	<i>Phragmites</i>	0,001	0,212	0,363		a		a

5.4. DISCUSIÓN

En relación con nuestras hipótesis iniciales, los resultados mostraron que: 1) hubo una fuerte componente temporal en el comportamiento biogeoquímico de los suelos debido a cambios en factores tales como la temperatura y el contenido en humedad del suelo; 2) el comportamiento descrito en el punto anterior estuvo modulado por la profundidad del suelo y la presencia/ausencia de *Phragmites* y su estado fisiológico en los diferentes períodos del año; 3) la concentración de nutrientes en el agua de inundación pareció tener un papel menor en la respuesta conjunta del sistema, pero fue en cierto modo relevante para la biomasa microbiana.

5.4.1. CAMBIOS TEMPORALES DE LAS CONDICIONES BIOGEOQUÍMICAS EN LOS HORIZONTES SUPERFICIALES DEL SUELO

Las oscilaciones de los valores del Eh en los horizontes superficiales siguieron un patrón típico de suelos hídricos, disminuyendo durante las fases de inundación (alcanzando condiciones anóxicas, $Eh < \approx +100$ mV de acuerdo con Otero y Macías, 2003) e incrementando durante las fases de secado (alcanzando condiciones óxicas, $Eh > \approx +350$ mV según Otero y Macías, 2003). Este patrón se observó independientemente de la presencia de *Phragmites* y del nivel de nutrientes en el agua de inundación, lo que indicó que: 1) el suelo actuó como un entorno adecuado para la actividad microbiana; 2) el O_2 se difundió en el suelo durante las fases de secado; 3) hubo aceptores de electrones alternativos al O_2 para la actividad anaeróbica durante las fases de inundación (Reddy y DeLaune, 2008). El comportamiento descrito se vio favorecido por la composición del agua de inundación que incluía una cantidad sustancial de materia orgánica soluble (sustrato para los microorganismos) y nitrato (aceptor de electrones adecuado para el metabolismo anaerobio).

Los cambios observados en el pH del suelo podrían atribuirse a diversos factores que actuaron conjuntamente. En suelos inundados, una bajada de los valores del Eh implica un consumo de protones (H^+), lo que puede conducir a un aumento del pH (Ponnamperuma *et al.*, 1966; Stumm y Sulzberger, 1992). Por tanto, los valores de pH

más altos alcanzados en los horizontes superficiales entre las semanas I1 y S21 del experimento podrían estar relacionados con sus valores más bajos de Eh (Figura 5.9a y 5.9c).

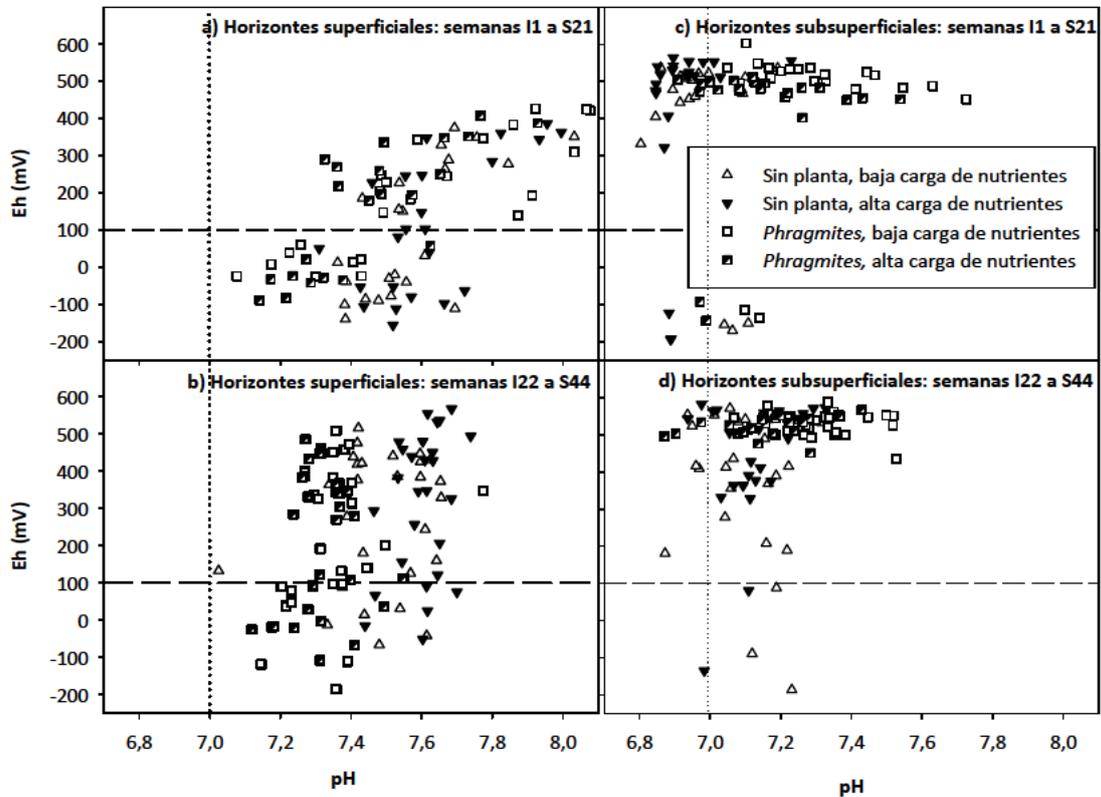


Figura 5.9. Potencial redox (Eh) vs. pH en los horizontes superficiales y subsuperficiales del suelo durante el experimento. Se designa con I a las semanas de inundación y con S a las de secado. Los números después de I o S indican la semana del experimento (por ejemplo, I22 fue la semana 22 del experimento; S21 fue la semana 21 del experimento). La línea vertical punteada indica condiciones neutras (pH = 7) y la línea discontinua horizontal el límite de las condiciones anóxicas (Eh < +100 mV).

Sin embargo, a ambas profundidades, la situación global fue más compleja y los cambios a lo largo del tiempo se vieron afectados por las condiciones de inundación–secado, la actividad microbiana y la presencia/ausencia de *Phragmites*. De hecho, en los horizontes superficiales, tanto el Eh como el pH disminuyeron durante las fases de inundación y aumentaron en los secados (correlación positiva significativa para todos los tratamientos, $r \geq 0,669$, $p \leq 0,05$). Nuestros resultados estuvieron de acuerdo con la dinámica del sistema $\text{CO}_2\text{--H}_2\text{CO}_3$ (Reddy y DeLaune, 2008). El CO_2 disuelto en el agua de los poros del suelo pudo formar ácido carbónico (H_2CO_3), un ácido débil que favorece la disminución del pH. Este proceso se favorece cuando el suelo está

inundado, debido a que el exceso de agua impide el intercambio gaseoso y conduce a una elevada presión de CO_2 ($p\text{CO}_2$) y una baja presión de O_2 ($p\text{O}_2$) (Greenway *et al.*, 2006; Hinsinger *et al.*, 2009). El fuerte descenso de los valores de pH observado en los horizontes superficiales durante las primeras cuatro fases de inundación (Figura 5.2a) podría estar relacionado con un aumento de la $p\text{CO}_2$ y una disminución de la $p\text{O}_2$. Un consumo intenso de carbono (C) orgánico por parte de los microorganismos, como respuesta a los pulsos de entrada de agua eutrofizada (como se muestra por la caída del Eh durante las fases de inundación, Figura 5.1a), conllevó la producción de CO_2 , que permaneció atrapado bajo el agua. A continuación, durante las fases de secado, cuando el O_2 penetró en el suelo, la $p\text{O}_2$ aumentó mientras que la $p\text{CO}_2$ disminuyó (como se muestra por las mayores emisiones de CO_2 , Figura 5.6), conduciendo a un aumento del pH hasta valores ≈ 8 . A partir de la semana I22, los cambios de pH no coincidieron con las variaciones del Eh, probablemente debido a la desaceleración de la actividad microbiana del suelo, lo que condujo a una menor producción de CO_2 , tal y como se explica en los párrafos siguientes.

En relación a la dinámica del COD, durante las dos primeras fases de inundación, las concentraciones tendieron a aumentar (Figura 5.4a), probablemente debido a la acumulación de compuestos orgánicos procedentes de una descomposición incompleta de la materia orgánica bajo condiciones de saturación en agua (Simões *et al.*, 2011). Sin embargo, durante las fases de secado, estos compuestos pudieron ser mineralizados rápidamente, debido a la estimulación de los microorganismos aerobios (Reddy y DeLaune, 2008), tal y como mostraron los picos de emisión de CO_2 en las semanas S4–S6 y S10–S12 (Figura 5.6). Por el contrario, entre las semanas I13–I16 (tercera fase de inundación –I(3)–), las concentraciones de COD no aumentaron (Figura 5.4a), lo que pudo atribuirse a un consumo mayor de materia orgánica por los microorganismos favorecido por las altas temperaturas del suelo (Figura 5.3b) (Conant *et al.*, 2008). Esta explicación se apoya en la bajada drástica de los valores del Eh entre el primer y tercer día después de la inundación de los mesocosmos en la semana I13 (de $\approx +200$ mV a ≈ 0 mV; Figura 5.1.a). En todos los tratamientos ensayados se obtuvo una correlación negativa significativa entre la temperatura del suelo y el Eh ($r \geq -0,330$, $p < 0,05$) y una correlación positiva significativa entre el CO_2 y la temperatura del suelo

($r \geq 0,660$, $p < 0,05$). Esto indica que la actividad microbiana y, por tanto, el consumo de O_2 que conduce a una disminución de los valores del Eh bajo condiciones de saturación en agua se vieron estimulados durante los meses más cálidos, como se ha comentado anteriormente (Reddy y DeLaune, 2008). El efecto negativo de las bajas temperaturas sobre la actividad microbiana fue más evidente a partir de la semana I30 y hasta el final del experimento (semana S44), con temperaturas del suelo $\approx 10\text{--}15^\circ\text{C}$ (Figura 5.3b), tal y como se muestra por una tendencia a una menor producción de CO_2 (Figura 5.6). Dicha tendencia fue menos evidente en el tratamiento *Phragmites* + alta carga de nutrientes donde la combinación de mayores concentraciones de nutrientes y la presencia de rizosfera pudo contribuir a mantener la actividad microbiana a niveles ligeramente más altos que en los otros tres tratamientos ensayados.

En los mesocosmos había dos fuentes de C orgánico: el C orgánico propio del suelo y los compuestos orgánicos añadidos con el agua de inundación. No se identificó el C de ambas fuentes, pero era de esperar que los microorganismos consumieran el segundo tipo más fácilmente, debido a que contenía mayores concentraciones de glucosa ($C_6H_{12}O_6$). Esto coincide con De Nobili *et al.* (2001) quienes encontraron que cantidades traza de sustancias simples y fácilmente degradables, como la $C_6H_{12}O_6$, podrían estimular la actividad microbiana al favorecer el paso de los microorganismos de un estado de letargo a la actividad. De hecho, las concentraciones similares de COD (entre ≈ 10 y $\approx 40\text{ mg L}^{-1}$, Figura 5.4a), independientemente de la carga de nutrientes, sugieren que la mayoría de los compuestos orgánicos añadidos con el agua de inundación se consumieron durante las primeras horas de inundación. En este sentido, la entrada de C orgánico exógeno en los mesocosmos no modificó sustancialmente la relación entre el COD autóctono y el alóctono, tal y como indicó un valor de IF > 2 (Figura 5.5c), lo que sugiere que los compuestos orgánicos disueltos (medidos como COD) tenían principalmente un origen autóctono (Wang *et al.*, 2013). De hecho, el ciclado de C orgánico lábil es muy rápido y a menudo puede aproximarse a una tasa de 5 a 10 veces por día (DeBusk y Reddy, 1998; Reddy y DeLaune, 2008). Por lo tanto, los resultados observados en relación a las concentraciones de COD (Figura 5.4a) deberían ser atribuibles principalmente a la suma de dos elementos: el C orgánico de origen microbiano y los compuestos orgánicos originados por el ataque microbiano tanto a las

fracciones estables de la materia orgánica soluble (constituida mayoritariamente por compuestos alquílicos y aromáticos) como de la materia orgánica particulada. El análisis de aromaticidad mostrado por la $SUVA_{254}$ (Figura 5.5a) indica un enriquecimiento del COD en restos aromáticos durante los tres primeros ciclos de inundación–secado (semanas I3 a S21), en concordancia con la temperatura más alta del suelo en los mesocosmos (Figura 5.3a). La mayor $SUVA_{254}$, junto con el mayor contenido de Phe durante estas semanas (Figura 5.5b), sugiere una actividad microbiana más intensa y, por tanto, un aumento de las tasas de degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes hasta que la temperatura del suelo disminuyó en la semana I22 (Figura 5.3b).

En vista de los resultados obtenidos en este estudio, la presencia de *Phragmites* tuvo un papel minoritario, si es que tuvo alguno, en el contenido y la dinámica del COD durante el experimento en el horizonte superficial. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Lindén *et al.* (2014) quienes encontraron un efecto notable de *Pinus sylvestris* sobre la degradación de la materia orgánica del suelo tras la incubación con $C_6H_{12}O_6$. Según estos autores, los carbohidratos frescos activarían los microorganismos del suelo y aumentarían su capacidad para extraer nutrientes de la materia orgánica en un fenómeno conocido como efecto promotor de la rizosfera (rhizosphere priming effect) (Zhu y Cheng, 2011). Debido a la existencia de numerosas incertidumbres en el mecanismo que rige el efecto promotor (Lindén *et al.*, 2014 y referencias citadas en el mismo), es difícil explicar la aparente discrepancia entre la bibliografía revisada y los resultados obtenidos en nuestro experimento. Quizás, las diferencias pueden ser atribuidas al diferente tamaño y morfología del sistema de raíces de las dos especies vegetales consideradas (*Phragmites* en el presente estudio y *Pinus* en Lindén *et al.*, 2014).

El CBM es un indicador de la población microbiana en el suelo (Jenkinson *et al.*, 2004), la cual se espera que esté más desarrollada en suelos con plantas, dado que la rizosfera proporciona una mejor estructura y recursos para que los microorganismos se adhieran y lleven a cabo los procesos necesarios para la transformación de elementos (Caffery y Kemp, 1990). En nuestro experimento, hubo concentraciones de

CBM significativamente más altas en los tratamientos con *Phragmites* durante las primeras 12 semanas (Figura 5.7), pero los valores cayeron fuertemente en la semana I16, probablemente como consecuencia de diversos factores que pudieron actuar conjuntamente. Una disminución drástica de las concentraciones de COD entre las semanas S10–I13 (Figura 5.4a) indica un pico de consumo de C orgánico soluble por los microorganismos, favorecido por la alta temperatura (Figura 5.3b). El consumo de O₂ asociado a la mejora de la actividad metabólica de los microorganismos ocasionó la disminución más fuerte de los valores del Eh entre las semanas I13–I16 en los horizontes superficiales e incluso en los subsuperficiales (Figura 5.1). Por lo tanto, la disminución de las concentraciones de COD, en combinación con las fuertes condiciones anóxicas alcanzadas, podría haber dañado a los microorganismos (Mentzer *et al.*, 2006; Somenahally *et al.*, 2011), conduciendo a una disminución de las concentraciones de CBM. Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos de McLatchey y Reddy (1998) quienes encontraron una disminución de 20 veces en el CBM cuando el Eh disminuyó por debajo de \approx -100 mV.

5.4.2. CAMBIOS TEMPORALES DE LAS CONDICIONES BIOGEOQUÍMICAS EN LOS HORIZONTES SUBSUPERFICIALES DEL SUELO

Al igual que en los horizontes superficiales, la evolución del Eh en los horizontes subsuperficiales arenosos no se vio afectada por la concentración de nutrientes en el agua de inundación. Sin embargo, la presencia de *Phragmites* moduló fuertemente la dinámica del Eh en los horizontes subsuperficiales (Figura 5.1b), alcanzando valores más bajos los tratamientos sin plantas.

En la mayoría de suelos hídricos se han descrito valores más bajos del Eh en profundidad (Reddy y DeLaune, 2008; Rostaminia *et al.*, 2011), debido a la disminución de la concentración de O₂ (Reddy y DeLaune, 2008). Sin embargo, cuando las condiciones ambientales no son favorables para la actividad microbiana, el O₂ no se consume y el Eh no disminuye, incluso en suelos saturados (Vepraskas y Faulkner, 2001). Esto último podría explicar los altos valores del Eh en los horizontes subsuperficiales (Figura 5.1b), con escaso contenido en materia orgánica y textura

arenosa (ver Tabla 4.3 del capítulo 4). De hecho, las caídas en los valores del Eh en los tratamientos sin plantas se produjeron al comienzo de las fases de secado (semanas S10, S17 y S27; Figura 5.1b) y, por lo tanto, podrían relacionarse principalmente con el flujo vertical de agua anóxica desde la parte superior hacia los horizontes más profundos cuando los grifos de drenaje estaban abiertos, más que con el consumo de O_2 por los microorganismos. Por lo tanto, el flujo de agua se vio favorecido por la textura arenosa de los horizontes subsuperficiales. En los tratamientos con *Phragmites*, los valores más altos del Eh, incluso durante las fases de secado, podrían estar relacionados parcialmente con la arquitectura del sistema de rizomas de *Phragmites* que contribuye a ahuecar el suelo, facilitando la penetración del aire (Hinsinger *et al.*, 2009). Sin embargo, el principal mecanismo que explica el entorno más oxidado en presencia de la rizosfera de *Phragmites* sea, probablemente, la difusión de O_2 a través del aerénquima, favorecida por la textura arenosa de los horizontes más profundos. *Phragmites* tiene la capacidad de introducir O_2 en el suelo a través de sus rizomas (Dickopp *et al.*, 2011) vía aerénquima (Armstrong, 1979; Dickopp *et al.*, 2011). Este mecanismo permite garantizar la respiración de las células de la raíz, lo que resulta en una acumulación local de O_2 alrededor de las raíces (Armstrong *et al.*, 2000), incrementando la pO_2 (Philippot *et al.*, 2009). Este fenómeno fue más intenso en los horizontes subsuperficiales que en los superficiales, como muestran las mayores diferencias entre los tratamientos con y sin plantas en profundidad. Esto concuerda con los hallazgos de Schöttelndreier y Falkengren-Greup (1999) quienes indicaron que el proceso está más bien confinado a la región apical de las raíces y rizomas.

Los valores del Eh solamente disminuyeron hasta alcanzar condiciones anóxicas en los horizontes subsuperficiales de los tratamientos con *Phragmites* entre las semanas I16–S17 (Figura 5.1b), las semanas más cálidas del experimento (media diaria de temperatura del suelo ≈ 30 °C, media diaria de temperatura del aire ≈ 35 °C; Figura 5.3b). Durante este periodo, la mayor parte de los tallos y hojas de *Phragmites* se secaron, y era de esperar que la capacidad de aireación del suelo disminuyera. De hecho, la capacidad de *Phragmites* para airear suelos se basa en dos mecanismos: uno de succión, debido al efecto Venturi en el extremo de las cañas muertas, y otro de presurización, debido a los gradientes en la concentración de vapor de agua (Colmer,

2003). Para que el primer mecanismo sea operativo es necesaria la presencia de tallos muertos rotos (tanto altos como bajos), mientras que la presión impulsada a través del flujo de gases requiere de tejidos vivos para generar gradientes de concentración de vapor de agua entre cámaras microporosas localizadas en la planta y el aire circundante. En nuestro experimento, las plantas de *Phragmites* no fueron perturbadas por factores tales como la fauna o el viento. Por lo tanto, no hubo tallos rotos y esto, junto con la quietud del aire dentro del invernadero y la alta humedad ambiental ($\approx 30\text{--}35\%$, Figura 5.3a), podría ayudar a entender el fracaso de la aireación en los horizontes subsuperficiales durante el período más cálido del experimento.

A partir de la semana S29 en adelante, el patrón de variación del Eh en los horizontes subsuperficiales de los tratamientos sin plantas cambió claramente. Los valores de Eh fueron más altos que en las semanas anteriores del experimento, sin caer por debajo de $\approx +300$ a $+200$ mV durante la quinta fase de secado y sin apenas cambios durante el último ciclo de inundación–secado (semanas I39–S44, Figura 5.1b). Esto último pudo estar relacionado con la desaceleración de la actividad microbiana durante el otoño e invierno.

En relación al pH, en ausencia de *Phragmites*, los horizontes subsuperficiales arenosos mostraron claramente valores de pH más bajos que los horizontes superficiales, independientemente de la concentración de nutrientes en el agua de inundación (Figura 5.2b). Se ha de destacar este resultado dado que la caracterización inicial de los materiales (suelo y arena) empleados en el experimento mostró un mayor valor de pH de la arena (ver Tabla 4.1 del capítulo 4). Probablemente, la escasa reactividad de las partículas de arena obstaculizó su capacidad para prevenir la bajada del pH a lo largo del experimento. Nuestros hallazgos resaltan que los procesos que tienen lugar en la solución del suelo durante eventos de inundación pueden modificar por sí mismos el entorno edáfico, de manera diferente dependiendo de la profundidad del suelo y la naturaleza de los materiales presentes. Esto último puntualiza la necesidad de considerar la estratificación del suelo como un factor en este tipo de estudios. Las diferencias entre ambos horizontes fueron menos evidentes en presencia de *Phragmites* entre las semanas I1–S21, y desaparecieron desde la semana I22 en

adelante (Figura 5.2, 5.9b y 5.9d). Entre las semanas I22–S44, el pH tendió a aumentar en ausencia de plantas (Figura 5.9d), probablemente debido al consumo de H^+ asociado a la mayor duración de la disminución del Eh (Figura 5.9d). Por lo tanto, en nuestro experimento, las plantas de *Phragmites* podrían haber impedido la disminución del pH mientras estaban fisiológicamente más activas, mediante la introducción de O_2 en el suelo (semanas I1–S21) y disminución de la pCO_2 . A partir de la semana I22 en adelante, una menor actividad, probablemente debido a una temperatura más baja, redujo la influencia de la rizosfera y los valores de pH disminuyeron.

La evolución de los parámetros fisiológicos de *Phragmites* apoya la interpretación realizada en el párrafo anterior. La tasa de fotosíntesis neta mostró oscilaciones durante todo el experimento en relación con el estado hídrico de los suelos, aumentando durante las fases de inundación y disminuyendo durante los secados (Figura 5.8a). Sin embargo, a partir de la tercera fase de secado este patrón cambió: entre las semanas S17–S19 la tasa de fotosíntesis neta fue más o menos constante, disminuyendo a partir de la semana S22 en adelante. Esto último podría indicar probablemente un cambio en el metabolismo de *Phragmites* que habría conducido a éstas a priorizar el llenado del sistema de rizomas en respuesta a las condiciones ambientales que anunciaban el final de la temporada cálida. Por el contrario, los valores de qP no cambiaron hasta el cuarto ciclo de inundación–secado (Figura 5.8b), lo que indica que no hubo un aparente retardo de las reacciones fotoquímicas hasta ese momento. El valor qP indica la proporción de centros de reacción del fotosistema II (PSII) que están abiertos. Valores bajos de qP indican una limitada capacidad del cloroplasto para canalizar los electrones del agua a aceptores de electrones implicados en las reacciones de oxidación–reducción (redox) (Maxwell y Johnson, 2000). Se observó una disminución notable de los valores de qP en la semana I24 (Figura 5.8b), independientemente del nivel de nutrición vegetal, poniendo de manifiesto el fenómeno de fotoinhibición que puede conducir eventualmente a la desmantelación del cloroplasto y la consiguiente muerte celular. De hecho, se observó un deterioro general de las partes aéreas de las plantas de *Phragmites* (*observación visual de los autores*) tras la semana I23, en concordancia con la bajada de la temperatura del suelo

(Figura 5.3a). Este hecho imposibilitó la determinación de los parámetros fotosintéticos a partir de la semana S27.

5.5. CONCLUSIONES

La presencia de *Phragmites* y la concentración de nutrientes en el agua de inundación tuvieron un papel diferente en la evolución temporal de las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo relacionadas con los procesos biogeoquímicos en humedales eutrofizados, y este papel estuvo fuertemente influenciado por la profundidad del suelo, la naturaleza de los materiales edáficos, y la temperatura.

En los horizontes superficiales de textura fina, la dinámica del Eh estuvo marcada principalmente por la existencia de condiciones alternantes de inundación-secado, independientemente de la presencia de *Phragmites*, la carga de nutrientes del agua y la temperatura del suelo. Sin embargo, la evolución de los valores del Eh en los horizontes subsuperficiales arenosos se vio afectada por la presencia de *Phragmites*. Las plantas de *Phragmites* contribuyeron a mantener valores altos de Eh (condiciones óxicas), los cuales se atribuyeron principalmente a la capacidad de esta especie para dirigir el O₂ de los tallos a las raíces a través del aerénquima, lo que conlleva una acumulación localizada de O₂. Esto último se vio favorecido por los materiales arenosos del horizonte subsuperficial y estuvo modulado por el rendimiento fisiológico de las plantas de *Phragmites* (medido como actividad fotosintética), que disminuyó durante el período más cálido del experimento (la temperatura del aire alcanzó los ≈40 °C), reduciendo su capacidad de airear los suelos lo que resultó en una disminución de los valores del Eh en los horizontes subsuperficiales.

La dinámica de pH se atribuyó principalmente al sistema CO₂-H₂CO₃. El papel de *Phragmites* en este proceso estuvo modulado por la profundidad del suelo y la actividad fisiológica de la planta que, a su vez, estuvo influida por la temperatura. Durante los meses más cálidos, la difusión de O₂ promovida por la rizosfera de

Phragmites obstaculizó la caída del pH (principalmente en los horizontes subsuperficiales arenosos).

La actividad de los microorganismos del suelo se estimuló en los meses más cálidos (temperatura del suelo de ≈ 20 a ≈ 30 °C), como muestran la mayor producción de CO₂ y la mayor SUVA₂₅₄ y contenido en Phe del agua de poro. Esto último ocurrió independientemente de la presencia de rizosfera y del contenido de nutrientes del agua de inundación, aunque la combinación de ambos factores contribuyó a un mayor CBM. Debido a esto, nuestras observaciones sugieren que la dinámica temporal del COD (en cuanto a cantidad y calidad) se atribuyó principalmente a las variaciones del C orgánico procedente del ataque microbiano de la materia orgánica propia del suelo, con un papel menos relevante de *Phragmites*, si es que tuvo alguno.

Nuestros hallazgos señalan la importancia de incorporar la escala temporal y vertical en la gestión de los carrizales de humedales para hacer frente a los aportes de aguas eutrofizadas. Hemos demostrado que la existencia de diferentes horizontes del suelo, con características distintas, determina el comportamiento biogeoquímico de humedales eutrofizados a lo largo del tiempo. *Phragmites* modula este comportamiento en función de dos aspectos: 1) la profundidad y las características del horizonte del suelo y, 2) el periodo del año que determina el estado fisiológico de las plantas. Aunque las prácticas de manejo, tales como la poda de la vegetación, deben planificarse de acuerdo con los objetivos específicos de cada caso (por ejemplo, retención de agua, retirada de nutrientes), la variabilidad estacional de las condiciones biogeoquímicas y el estado fisiológico de las plantas también deberían de ser tomadas en cuenta.

5.6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL2010–20214). La Dra. M. Nazaret González Alcaraz agradece a la Fundación Ramón Areces por la financiación de la beca post–doctoral en el Department of Ecological Science, Faculty of Earth and Life Sciences, Vrije Universiteit, Amsterdam

(Holanda). El Dr. Héctor M. Conesa Alcaraz agradece al Ministerio de Economía y Competitividad y a la Universidad Politécnica de Cartagena por la financiación a través del programa "Ramón y Cajal" (Ref. RYC–2010–05665). D. Antonio López Orenes recibió una beca pre–doctoral (AP2012–2559), financiada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

5.7. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F.J., Egea, C. 2006. Phosphorus and nitrogen content in the water of a coastal wetland in the Mar Menor lagoon (SE Spain): relationships with effluents from urban and agricultural areas. *Water, Air and Soil Pollution*, 173: 21–38.

Armstrong, W. 1979. Aeration in higher plants. *Advances in Botanical Research*, 7: 225–232.

Armstrong, W., Cousin, D., Armstrong, J., Turner, D.W., Beckett, P.M. 2000. Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas–exchange with the rhizosphere: a microelectrode study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany*, 86: 687–703.

Caffery, J.M., Kemp, W.M. 1990. Nitrogen cycling in sediments with estuarine populations of *Potamogeton perfoliatus* and *Zostera marina*. *Marine Ecology–Progress Series*, 66: 147–160.

Colmer, T.D. 2003. Long–distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell and Environment*, 26: 17–36.

Conant, R.T., Drijberw, R.A., Haddix, M.L., Parton, W.J., Paul, E.A., Plantex, A.F., Six, J., Steinweg, M. 2008. Sensitivity of organic matter decomposition to warming varies with its quality. *Global Change Biology*, 14: 868–877.

- De Nobili, M., Contin, M., Mondini, C., Brookes, P.C. 2001. Soil microbial biomass is triggered into activity by trace amounts of substrate. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 3701–3709.
- DeBusk, W.F., Reddy, K.R. 1998. Turnover of detrital organic carbon in a nutrient-impacted Everglades marsh. *Soil Science Society of America Journal*, 62: 1460–1468.
- Dickopp, J., Kazda, M., Cízková, H. 2011. Differences in rhizome aeration of *Phragmites australis* in a constructed wetland. *Ecological Engineering*, 37: 1647–1653.
- Fiedler, S., Vepraskas, M.J., Richardson, J.J. 2007. Soil redox potential: importance, field measurements, and observations. *Advances in Agronomy*, 94: 1–54.
- Greenway, H., Armstrong, W., Colver, T.D. 2006. Conditions leading to high CO₂ (> 5 kPa) in waterlogged–flooded soils and possible effects on root growth and metabolism. *Annals of Botany*, 98: 9–32.
- González-Alcaraz, M.N., Egea, C., Jiménez-Cárceles, F.J., Párraga, I, María-Cervantes, A. Delgado, M.J., Álvarez-Rogel, J. 2012. Storage of organic carbon, nitrogen and phosphorus in the soil–plant system of *Phragmites australis* stands from a eutrophicated Mediterranean salt marsh. *Geoderma*, 185–186: 61–72.
- Goulding, K. 2000. Nitrate leaching from arable and horticultural land. *Soil Use and Management*, 16: 145–151.
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M., 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, 321: 117–152.
- Jenkinson, D.S., Brookes, P.C., Powlson, D.S. 2004. Citation classics. Measuring soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 5–7.

- Lindén, A., Heinonsalo, J., Burchmann, N., Oinonen, M., Sonninen, E., Hiltunen, E., Pumpanen, J. 2014. Contrasting effects of increased carbon input on boreal SOM decomposition with and without presence of living root system of *Pinus sylvestris* L. *Plant and Soil*, 77: 145–158.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659–668.
- McLatchey, G.P., Reddy, K.R. 1998. Regulation of organic matter decomposition and nutrient release in a wetland soil. *Journal of Environmental Quality*, 27: 1268–1274.
- Mentzer, J.L., Goodman, R.M., Balser, T.C. 2006. Microbial response over time to hydrologic and fertilization treatments in a simulated wet prairie. *Plant and Soil*, 284: 85–100.
- Mitsch, W., Day, J.J. W., William, W.J., Groffman, P.N., Hey, D.H, Randall, G.W., Wang, N. 2001. Reducing nitrogen loading to the Gulf of Mexico from the Mississippi River Basin: strategies to counter a persistent ecological problem. *Bioscience*, 51: 373–388.
- Mitsch, W.J., Gosselink, J.G. 2007. *Wetlands*. Wiley, New York, EEUU. 234 pp.
- Otero, X.L., Macías, F. 2003. Spatial variation in pyritization of trace metals in salt march soils. *Biogeochemistry*, 62: 59–86.
- Philippot, L., Hallin, S., Börjesson, G., Baggs, E.M. 2009. Biogeochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change. *Plant and Soil*, 321: 61–81.
- Ponnamperuma, F.N., Martinez, E., Loy, T. 1966. Influence of redox potential and partial pressure of carbon dioxide on pH values and suspension effect of flooded soils. *Soil Science*, 101: 421–431.

- Reddy, K.R., DeLaune, R.D. 2008. *Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications*, first ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. 757 pp.
- Rostaminia, M., Mahmoodi, S., Gol Sefidi, H.T., Pazira, E., Kafaei, S.B. 2011. Study of reduction–oxidation potential and chemical characteristics of a paddy field during rice growing season. *Journal of Applied Sciences*, 11: 1004–1011.
- Saedd, T., Sun, G. 2012. A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetland: dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. *Journal of Environmental Management*, 112: 429–448.
- Sánchez-Carrillo, S., Álvarez-Cobelas, M. 2001. Nutrient dynamics and eutrophication patterns in a semi–arid wetland: the effects of fluctuating hydrology. *Water, Air and Soil Pollution*, 131: 97–118.
- Schöttelndreier, M., Falkengren-Gruep, U. 1999. Plant induced alteration in the rhizosphere and the utilization of soil heterogeneity. *Plant and Soil*, 209: 297–309.
- Simões, M.P., Caladoa, M.L., Madeirab, M., Gazarinia, L.C. 2011. Decomposition and nutrient release in halophytes of a Mediterranean salt marsh. *Aquatic Botany*, 94: 119–126.
- Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C. 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100: 179–196.
- Somenahally, A.C., Hollister, E.B., Loeppert, R.H., Yan, W., Gentry, T.J. 2011. Microbial communities in rice rhizosphere altered by intermittent and continuous flooding in fields with long–term arsenic application. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 1220–1228.

SPSS Inc. Manual del usuario del SPSS Base 15.0 2006. SPSS Inc, Chicago, EEUU.

Stumm, W., Sulzberger, B. 1992. The cycling of iron in natural environments: considerations based on laboratory studies of heterogeneous redox processes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56: 3233–3257.

Thullen, J.S., Sartoris, J.J., Walton, W.E. 2002. Effects of vegetation management in constructed wetland treatment cells on water quality and mosquito production. *Ecological Engineering*, 18: 441–457.

Vepraskas M.J., Faulkner, S.P. 2001. Redox chemistry of hydric soils. En: Richardson, J. L., Vepraskas, M. J. (Eds.). *Wetlands soils. Genesis, hydrology, landscapes and classification*. Lewis Publishers, Florida. pp. 85–106.

Vymazal, J. 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *The Science of the Total Environment*, 380: 48–65.

Wang, Y., Zhang, D., Shen, Z., Feng, C., Chen, J. 2013. Revealing sources and distribution changes of dissolved organic matter (DOM) in pore water of sediment from the Yangtze estuary. *PLoS ONE* 8 (10), e76633. doi: 10.1371/journal.pone.0076633.

Zhang, H., Cui, B., Hong, J., Zhang, K. 2011. Synergism of natural and constructed wetlands in Beijing, China. *Ecological Engineering*, 37: 128–138.

Zhu, B., Cheng, W. 2011. Rhizosphere priming effect increases the temperature sensitivity of soil organic matter decomposition. *Global Change Biology*, 17: 2172–2181.

CAPÍTULO 6

Dinámica del nitrógeno

Nitrate removal and potential soil N₂O emissions in eutrophic salt marshes with and without *Phragmites australis*.

(Eliminación de nitratos y emisiones potenciales de N₂O del suelo en saladares eutrofizados con y sin *Phragmites australis*).

Álvarez-Rogel, J., Tercero, M.C., Arce, M.I., Delgado, M.J., Conesa, H.M., González-Alcaraz, M.N.

Geoderma 282 (2016), 49–58. DOI 10.1016/j.geoderma.2016.17.011

RESUMEN

El objetivo específico de esta parte del trabajo fue evaluar la capacidad de eliminación de N-NO_3^- , así como las emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$, en humedales afectados por aguas eutrofizadas y determinar si dichos procesos están condicionados por la carga de nutrientes, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año. Para ello, mesocosmos de metacrilato se llenaron con un suelo salino, con y sin la presencia de *Phragmites*, y se sometieron a condiciones alternantes de inundación–secado con agua de baja ($\text{NO}_3^- = 20 \text{ mg L}^{-1}$) y alta ($\text{NO}_3^- = 200 \text{ mg L}^{-1}$) carga de nutrientes. Durante 44 semanas se midieron regularmente las concentraciones de N-NO_3^- y N-NH_4^+ en el agua de poro del suelo a dos profundidades y en el agua de drenaje, así como las emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo a la atmósfera. En los horizontes superficiales del suelo se eliminó más del 80 % de N-NO_3^- , independientemente de la presencia de *Phragmites*, la carga de nutrientes y el periodo del año. El proceso de desnitrificación pareció ser el principal mecanismo responsable de esto. En los horizontes subsuperficiales del suelo el N-NO_3^- disminuyó un promedio del ≈ 83 % en presencia de *Phragmites* y un ≈ 32 % sin plantas durante el período más cálido (temperatura del suelo de ≈ 15 a ≈ 30 °C), pero la efectividad se redujo a < 10 % durante el período más frío (temperatura del suelo de ≈ 10 a ≈ 15 °C). Las concentraciones de N-NH_4^+ aumentaron durante las fases de inundación (alcanzando $2\text{--}6 \text{ mg L}^{-1}$), y los resultados indicaron que éste se nitrificó durante las siguientes fases de secado. En los tratamientos con *Phragmites*, durante las fases de secado, hubo una tendencia a disminuir las emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo, señalando que las plantas absorbieron el N-NO_3^- recién formado. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, se propone la poda de las plantas de *Phragmites* al comienzo del verano, pero con un lapso de tiempo determinado con el fin de permitir la absorción del N-NO_3^- por las plantas antes del secado completo de los cursos de agua.

Palabras clave: Gases de efecto invernadero; Filtros verdes; Laguna del Mar Menor; Ciclo del nitrógeno; Humedales; Ciclos de inundación–secado.

6.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO ESPECÍFICO

La producción antropogénica masiva de fertilizantes ha llevado a la degradación de numerosos ecosistemas de gran valor en todo el mundo, incrementando así los riesgos de eutrofización de los cuerpos de agua (Di y Cameron, 2002; Robertson *et al.*, 2013). Tal problema es de particular importancia en cuencas con alta proporción de uso agrícola, debido a que sus efluentes se encuentran enriquecidos a menudo en nitrógeno (N), principalmente en forma de nitrato (NO_3^-) derivado de los fertilizantes (Moss, 2008), que no se fija al complejo de cambio del suelo. Es ampliamente conocido el valor de los humedales en la mitigación de los efectos negativos del exceso de NO_3^- , debido a su capacidad para actuar como filtros verdes (Hoffmann *et al.*, 2012; Lind *et al.*, 2013). Por ello, la desviación de efluentes enriquecidos en N hacia humedales, tanto naturales como artificiales, es una estrategia adecuada para depurar las aguas eutrofizadas. Sin embargo, dicha estrategia puede ser cuestionada en el actual escenario de cambio climático ante el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), como el óxido nitroso (N_2O) (Hefting *et al.*, 2013; Audet *et al.*, 2014; Jacobs y Harrison, 2014).

Como se ha mencionado en el capítulo 1, la dinámica del N en humedales está influida por varios procesos complejos interconectados, incluyendo la mineralización, nitrificación–desnitrificación, absorción por las plantas, fijación y reducción desasimilatoria del nitrato (DNRA) (Tiedje, 1998; Saeed y Sun, 2012). Uno de los principales mecanismos en la retirada de N del medio es la reducción del NO_3^- a formas gaseosas (N_2O o dinitrógeno $-\text{N}_2-$) a través del proceso de desnitrificación (van Oostrom y Russell, 1994; Xue *et al.*, 1999; Vymazal, 2007). La DNRA es otra vía importante de reducción del NO_3^- , pero en este proceso el N se conserva en el sistema en forma de amonio (NH_4^+), que puede llegar a suponer un problema para los organismos acuáticos ya que elevadas concentraciones de NH_4^+ pueden resultar tóxicas (Ip *et al.*, 2001; Ma y Aelion, 2005).

El proceso de desnitrificación puede tener importantes consecuencias para la atmósfera dado que el N_2O es un potente GEI, con un potencial de calentamiento

global 298 veces más potente que el dióxido de carbono (CO₂) en un horizonte temporal de 100 años (IPCC, 2007). Sin embargo, y aunque se haya prestado más atención a las emisiones de N₂O de diferentes fuentes (Yang *et al.*, 2012), algunos estudios sugieren que las ventajas de los beneficios ambientales de la purificación de las aguas podrían ser mayores que los riesgos de emisión de GEI (Hefting *et al.*, 2013).

La magnitud de las emisiones de N₂O de los humedales se encuentra mediada por una serie de factores bióticos y abióticos, incluyendo la presencia de sulfuros y oxígeno (O₂) así como la composición de la comunidad vegetal y microbiana (Picek *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2008; Jacobs y Harrison, 2014). Existe una amplia variedad de resultados sobre la influencia de los diferentes tipos de humedales en las emisiones de N₂O. Mander *et al.* (2014) revisaron las emisiones de GEI de diferentes tipos de humedales artificiales, y llegaron a la conclusión de que tanto el régimen hídrico como la carga de aguas residuales y la presencia de aerénquima en las plantas son aspectos clave en su comportamiento. Hefting *et al.* (2003) enfatizaron la emisión sustancial de N₂O de una zona de ribera cargada en NO₃⁻. Moseman-Valtierra *et al.* (2011) demostraron que las adiciones antropogénicas de NO₃⁻ a un saladar costero incrementaron los flujos de N₂O, presentándose las emisiones más altas durante la estación más cálida. En otros casos, las conclusiones de los estudios sobre emisiones de N₂O fueron dudosas, debido a la gran variabilidad obtenida (por ejemplo, Jørgensen *et al.*, 2012; Audet *et al.*, 2013). Jørgensen *et al.* (2012) estudiaron las tendencias temporales en los flujos de N₂O en un humedal con presencia de *Phalaris arundinacea*. Dichos autores encontraron que los flujos de N₂O estaban relacionados con la concentración de O₂, el nivel de agua, la disponibilidad de N-mineral, pero también con la intensidad de la luz. La importancia de este último factor se vinculó con su influencia sobre la actividad de la planta, la cual facilitó el transporte de N₂O desde la zona de la raíz a la atmósfera. La complejidad del fenómeno y la amplia variedad de factores que pueden influir hacen necesarios estudios que contribuyan a una mejor comprensión de los procesos implicados en la reducción del NO₃⁻ y la emisión del N₂O, y que permitan cuantificar la posible contribución de los humedales eutrofizados al calentamiento global.

El objetivo específico de esta parte del trabajo fue evaluar la capacidad de eliminación de N-NO_3^- , así como las emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$, en humedales afectados por aguas eutrofizadas y determinar si dichos procesos están condicionados por la carga de nutrientes, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año. Para ello, en el experimento realizado en mesocosmos, con alternancia de condiciones de inundación–secado durante 44 semanas con agua de baja ($\text{NO}_3^- = 20 \text{ mg L}^{-1}$) y alta ($\text{NO}_3^- = 200 \text{ mg L}^{-1}$) carga de nutrientes, se monitorizaron las concentraciones de N-NO_3^- y N-NH_4^+ en el agua de poro y drenajes, y las emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo (ver capítulo 4). En base a estudios previos de campo (Álvarez-Rogel *et al.*, 2006; González-Alcaraz *et al.*, 2012), en los que se observó cómo el agua que fluye a lo largo del saladar de la Marina del Carmolí (saladar objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral) es depurada, la hipótesis de partida fue que el sistema suelo–planta de este saladar puede ser altamente eficaz en la eliminación de NO_3^- y que la desnitrificación juega un papel importante en este proceso.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente capítulo recoge los resultados relacionados con la evolución de las concentraciones de N-NO_3^- y N-NH_4^+ en el agua de poro del suelo y los drenajes, y las emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo a la atmósfera. Para una descripción detallada de la metodología seguida ver capítulo 4.

En cuanto al análisis estadístico de los datos, para cada horizonte del suelo (superficial y subsuperficial), la evolución de las distintas variables a lo largo del tiempo y las diferencias entre los diferentes tratamientos ensayados (sin planta + baja carga de nutrientes; sin planta + alta carga de nutrientes; *Phragmites* + baja carga de nutrientes; *Phragmites* + alta carga de nutrientes) se analizaron con un ANOVA de medidas repetidas (ANOVA–MR). Los factores incluidos en el análisis fueron: (1) factor inter–sujetos, el tratamiento, con cuatro niveles, y (2) factor intra–sujetos, el tiempo (factor con medidas repetidas), con tantos niveles como muestreos realizados (por ejemplo, para la concentración de N-NO_3^- en el agua de poro $n = 39$; ver Tabla 4.3 del

capítulo 4). Las variables dependientes incluidas en el análisis fueron los parámetros analizados a lo largo del experimento en el agua de poro del suelo (N-NO_3^- , N-NH_4^+) y el $\text{N-N}_2\text{O}$ potencialmente desprendido a la atmósfera. Cuando los datos no cumplían el requerimiento de esfericidad de acuerdo al test de esfericidad de Maulchly, se optó por utilizar el estadístico F univariado aplicando el índice corrector épsilon en base a las estimaciones de Greenhouse–Geisser, Huynh–Feldt y límite inferior (SPSS Inc, 2006). Un efecto significativo del tiempo indica que los cambios de una variable dependiente, es decir su variación temporal, fueron significativos a lo largo del experimento, independientemente del tratamiento ensayado. Un efecto significativo de la interacción tiempo x tratamiento indica que la evolución de una variable dependiente a lo largo del tiempo fue diferente entre tratamientos. Un efecto significativo del tratamiento indica que los valores medios de una variable dependiente fueron diferentes entre los tratamientos ensayados. Cuando el tratamiento fue un factor significativo, se realizaron comparaciones post–hoc con el test de Bonferroni para identificar diferencias entre grupos. La relación entre las diversas variables se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. CONCENTRACIONES DE N-NO_3^- Y N-NH_4^+ EN EL AGUA DE PORO Y DRENAJES

Las concentraciones de N-NO_3^- en el agua de poro evolucionaron significativamente a lo largo del experimento en ambos horizontes del suelo (efecto del tiempo, $p \leq 0,004$), independientemente de la carga de nutrientes del agua de inundación. Tras cada adición de agua, las concentraciones de N-NO_3^- en el agua de poro mostraron un fuerte descenso, con tendencia a alcanzar un mínimo de concentración al quinto día de inundación en los tratamientos con agua de baja carga de nutrientes y en la tercera semana de inundación en los de agua de alta carga de nutrientes (Figuras 6.1 y 6.2). Durante las fases de secado, las concentraciones de N-NO_3^- en el agua de poro tendieron a aumentar, excepto en el horizonte subsuperficial de los tratamientos con *Phragmites* a ambas cargas de nutrientes (Figuras 6.1 y 6.2). Como era de esperar, el ANOVA–MR mostró un efecto significativo de la interacción

tiempo x tratamiento ($p \leq 0,032$). Las concentraciones de N-NO_3^- en el agua de poro fueron significativamente inferiores en los tratamientos con *Phragmites* (efecto del tratamiento, $p \leq 0,005$), independientemente de la carga de nutrientes del agua de inundación y de la profundidad del suelo, excepto en el horizonte subsuperficial de los tratamientos con agua de baja carga de nutrientes, donde no hubieron diferencias entre mesocosmos con y sin *Phragmites* (Figura 6.1.a2 vs. 6.1.b2).

Con el fin de obtener una visión más clara del comportamiento del N-NO_3^- en el agua de poro del sistema suelo-planta, el ANOVA-MR se aplicó por separado a los datos de las fases de inundación y de secado. Los resultados indicaron un efecto significativo del tiempo en ambos horizontes del suelo ($p \leq 0,01$), independientemente de los tratamientos ensayados. En presencia de agua de baja carga de nutrientes (tanto en las fases de inundación como en las de secado), y de agua de alta carga de nutrientes en las fases de secado, los horizontes superficiales y subsuperficiales del suelo tuvieron resultados similares: la interacción tiempo x tratamiento fue significativa ($p \leq 0,01$), y los tratamientos con *Phragmites* mostraron concentraciones significativamente menores de N-NO_3^- en el agua de poro (efecto del tratamiento, $p \leq 0,009$). Por el contrario, durante las fases de inundación en los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes, las concentraciones de N-NO_3^- en el agua de poro fueron similares con y sin *Phragmites*.

Contrariamente al comportamiento del N-NO_3^- , las concentraciones de N-NH_4^+ en el agua de poro alcanzaron un máximo al final de las fases de inundación mientras que disminuyeron durante los secados (Figuras 6.1 y 6.2). Cuando los datos de las fases de inundación y de secado se consideraron conjuntamente, el efecto del tiempo ($p \leq 0,022$) y de la interacción tiempo x tratamiento ($p \leq 0,036$) fueron significativos. En presencia de *Phragmites*, las concentraciones de N-NH_4^+ en el agua de poro fueron significativamente más bajas (efecto del tratamiento, $p \leq 0,026$), excepto en el horizonte superficial del tratamiento con agua de alta carga de nutrientes (Figura 6.2.b1). Cuando los datos de las fases de inundación y de secado se consideraron por separado, la evolución temporal de las concentraciones de N-NH_4^+ en el agua de poro fue significativa en ambos casos (efecto del tiempo, $p \leq 0,017$), pero la interacción

tiempo x tratamiento sólo fue significativa durante las fases de inundación ($p \leq 0,013$). En los tratamientos con agua de baja carga de nutrientes, en ambos horizontes del suelo, la presencia de *Phragmites* contribuyó significativamente a mantener concentraciones de N-NH_4^+ en el agua de poro más bajas (efecto del tratamiento, $p \leq 0,045$; Figura 6.1). Sin embargo, esta tendencia no fue tan evidente en los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes donde sólo en los horizontes subsuperficiales hubo concentraciones de N-NH_4^+ en el agua de poro significativamente inferiores en presencia de *Phragmites* (efecto del tratamiento, $p = 0,005$; Figura 6.2).

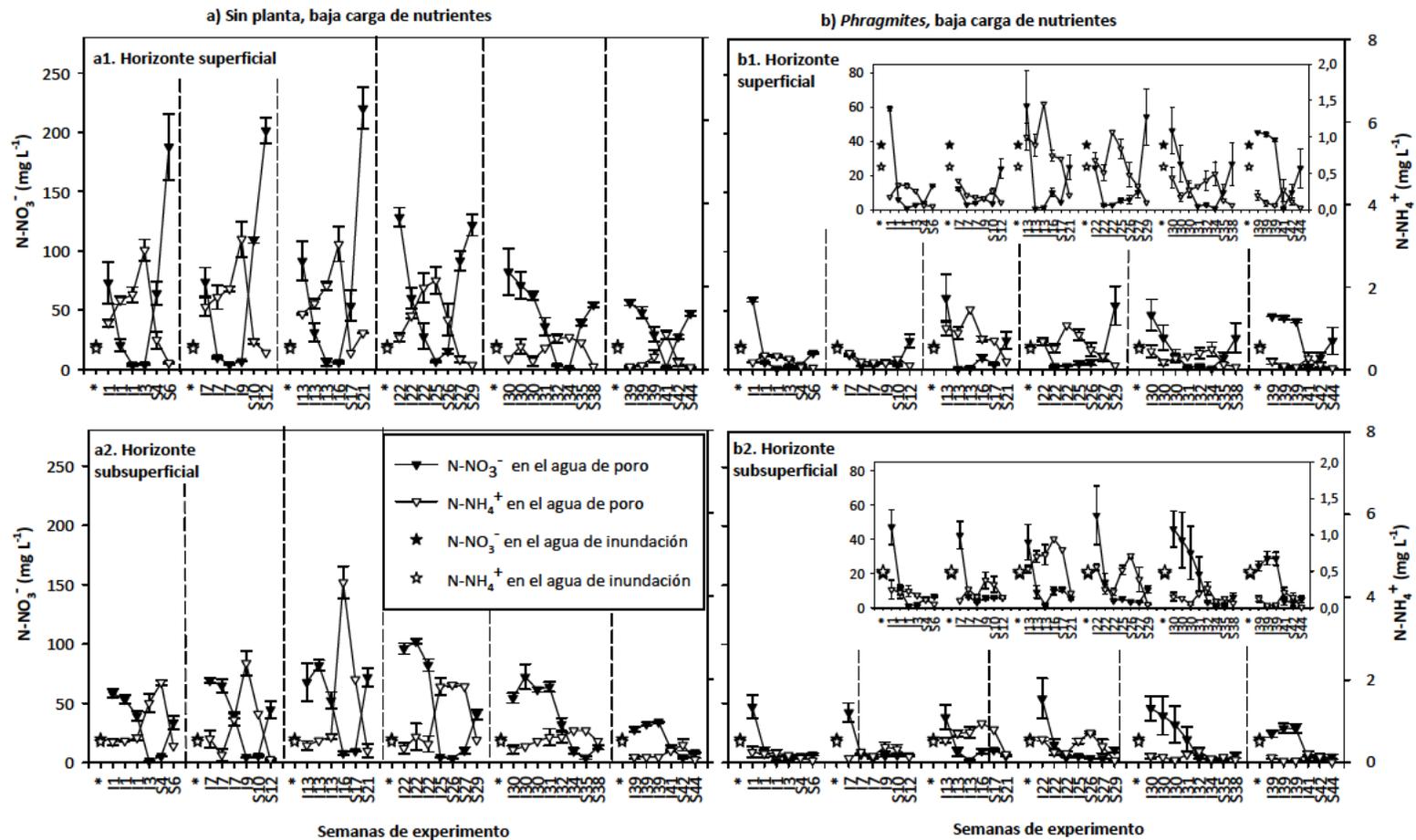


Figura 6.1. Evolución de las concentraciones de N-NO_3^- y N-NH_4^+ en el agua de poro durante el experimento en los horizontes superficiales y subsuperficiales del suelo de los tratamientos con baja carga de nutrientes. Los valores son la media \pm error estándar ($n = 3$). Con una I se designa a las fases de inundación y con una S a las de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I22 fue la semana 22 del experimento que perteneció a la cuarta fase de inundación; S35 fue la semana 35 del experimento que perteneció a la quinta fase de secado). Durante la primera semana de cada fase de inundación se tomaron muestras durante tres días alternos. Con un asterisco (*) se designa a la adición de agua eutrofizada al inicio de cada fase de inundación. Baja carga de nutrientes: $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$.

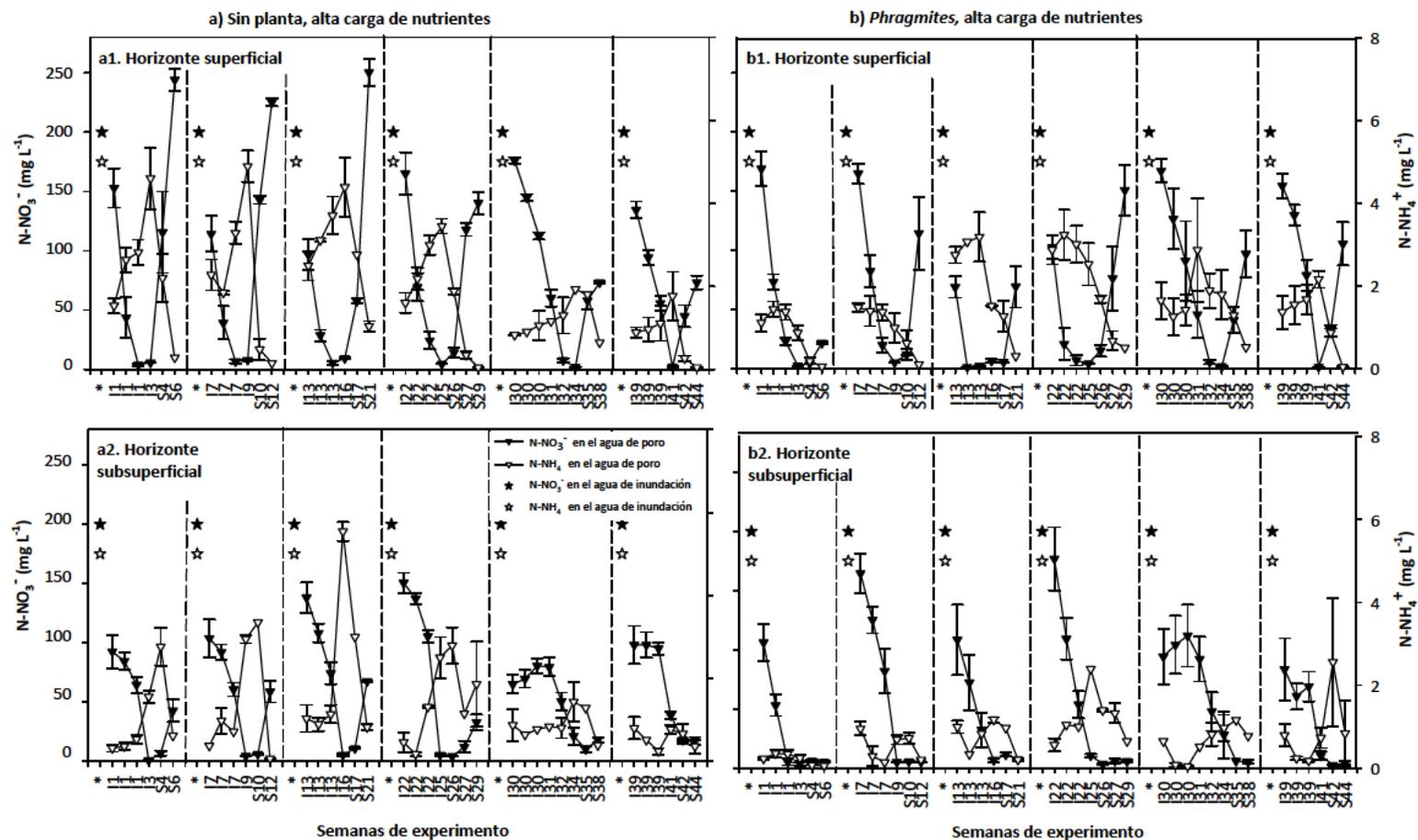


Figura 6.2. Evolución de las concentraciones de N-NO₃⁻ y N-NH₄⁺ en el agua de poro durante el experimento en los horizontes superficiales y subsuperficiales del suelo de los tratamientos con alta carga de nutrientes. Los valores son la media ± error estándar (n = 3). Con una I se designa a las fases de inundación y con una S a las de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, 122 fue la semana 22 del experimento que perteneció a la cuarta fase de inundación; S35 fue la semana 35 del experimento que perteneció a la quinta fase de secado). Durante la primera semana de cada fase de inundación se tomaron muestras durante tres días alternos. Con un asterisco (*) se designa a la adición de agua eutrofizada al inicio de cada fase de inundación. Alta carga de nutrientes: 200 mg L⁻¹ NO₃⁻.

Respecto al agua de los drenajes, no hubo diferencias en las concentraciones de N-NO_3^- entre los diferentes tratamientos ensayados y por lo tanto los datos se promediaron conjuntamente ($\approx 1 \text{ mg L}^{-1}$; Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Eficiencia de los mesocosmos experimentales para depurar el N-NO_3^- del agua eutrofizada de inundación. Los valores son la media de las seis fases de inundación \pm desviación estándar (para cada fase de inundación $n = 3$). Valores negativos denotan acumulación de N-NO_3^- . BC: baja carga de nutrientes, $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$. AC: alta carga de nutrientes, $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$.

Tratamiento	Agua de inundación vs. Agua de drenaje	Promedio del % de reducción de N-NO_3^- en el agua de poro entre el primer y quinto día de las fases de inundación	
	A) N-NO_3^- en el agua de drenaje (mg L^{-1}) B) % de reducción (entrada vs. salida)	Semanas I1-S29	Semanas I30-S44
Sin planta, BC	A) $0,94 \pm 0,19$	S: 91 ± 4	S: 34 ± 13
	B) 85 ± 5	Sub: 28 ± 6	Sub: -18 ± 5
Sin planta, AC	A) $1,04 \pm 0,22$	S: 93 ± 3	S: 47 ± 11
	B) 98 ± 1	Sub: 37 ± 4	Sub: -10 ± 13
<i>Phragmites</i> , BC	A) $0,79 \pm 0,14$	S: $88 \pm 7,3$	S: 42 ± 22
	B) 85 ± 4	Sub: $94 \pm 1,3$	Sub: 6 ± 24
<i>Phragmites</i> , AC	A) $1,03 \pm 0,46$	S: 91 ± 2	S: 47 ± 2
	B) 98 ± 1	Sub: 71 ± 9	Sub: -1 ± 18

6.3.2. EMISIONES POTENCIALES DE $\text{N-N}_2\text{O}$ DEL SUELO

El ANOVA-MR indicó que la evolución temporal de las emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo durante el experimento (Figura 6.3) fue significativa (efecto del tiempo, $p \leq 0,001$), así como la interacción tiempo x tratamiento ($p \leq 0,025$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas para el $\text{N-N}_2\text{O}$ potencial emitido con y sin plantas de *Phragmites*, para ambos tipos de agua, tanto cuando se consideraron todos los datos en conjunto como cuando se separaron las fases de inundación y de secado (Figura 6.4). Este resultado podría atribuirse a la gran variabilidad en las concentraciones obtenidas, una característica común en el estudio de las emisiones de

N₂O (Audet *et al.*, 2014). En cuanto a las emisiones potenciales de N–N₂O acumuladas a lo largo del experimento, éstas fueron muy similares en los tratamientos con y sin plantas para agua de baja carga de nutrientes, mientras que fueron claramente superiores en presencia de *Phragmites* en los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes (Figura 6.3). Los picos de emisión se detectaron principalmente durante la primera semana de las fases de inundación, mostrando los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes las mayores emisiones potenciales de N–N₂O del suelo (máximo $\approx 8150 \mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ en la semana I30, Figura 6.3.b). Sin embargo, también se detectaron picos de emisión durante algunas de las fases de secado (por ejemplo, $\approx 2000\text{--}3000 \mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ en la semana S17; Figura 6.3) pero, en este caso, las diferencias entre los dos tipos de aguas no fueron tan evidentes. Durante las fases de inundación, los tratamientos con plantas de *Phragmites* mostraron los mayores picos de emisión, mientras que lo contrario sucedió durante las fases de secado (Figuras 6.3 y 6.4). Se puede asumir que las concentraciones potenciales de N–N₂O obtenidas podrían estar sesgadas debido a las limitaciones del método (ver apartado 4.4.3 del capítulo 4), pero consideramos que los cambios temporales y las comparaciones entre los tratamientos ensayados son adecuados.

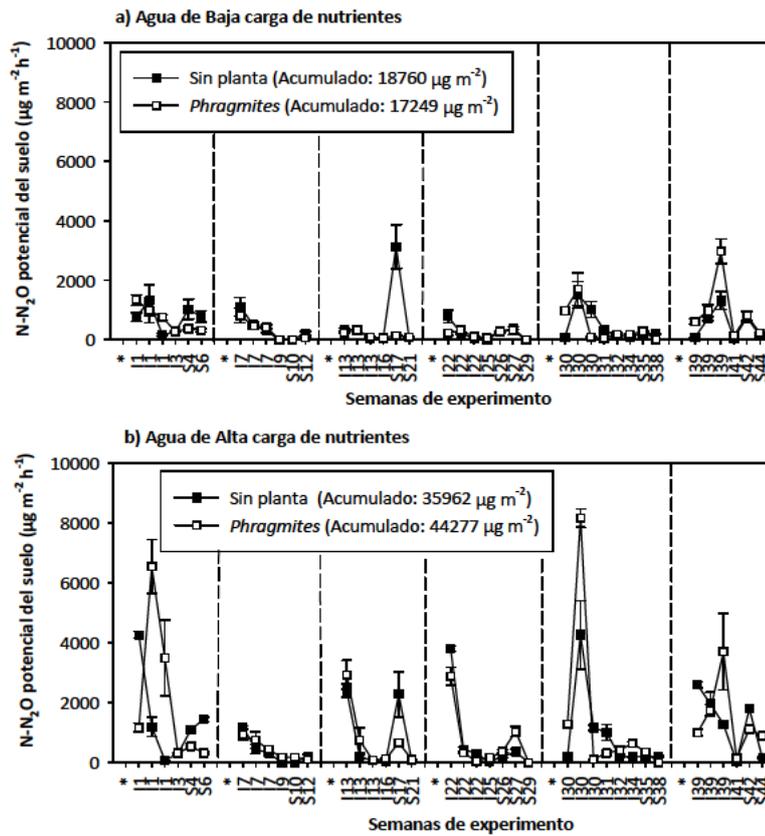


Figura 6.3. Emisiones potenciales de N–N₂O del suelo durante el experimento. Los valores son la media ± error estándar (n = 3). Con una I se hace referencia a las fases de inundación y con una S a las de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, 122 fue la semana 22 del experimento que perteneció a la cuarta fase de inundación; S35 fue la semana 35 del experimento que perteneció a la quinta fase de secado). Durante la primera semana de cada fase de inundación se tomaron muestras durante tres días alternos. Con un asterisco (*) se designa a la adición de agua eutrofizada al inicio de cada fase de inundación.

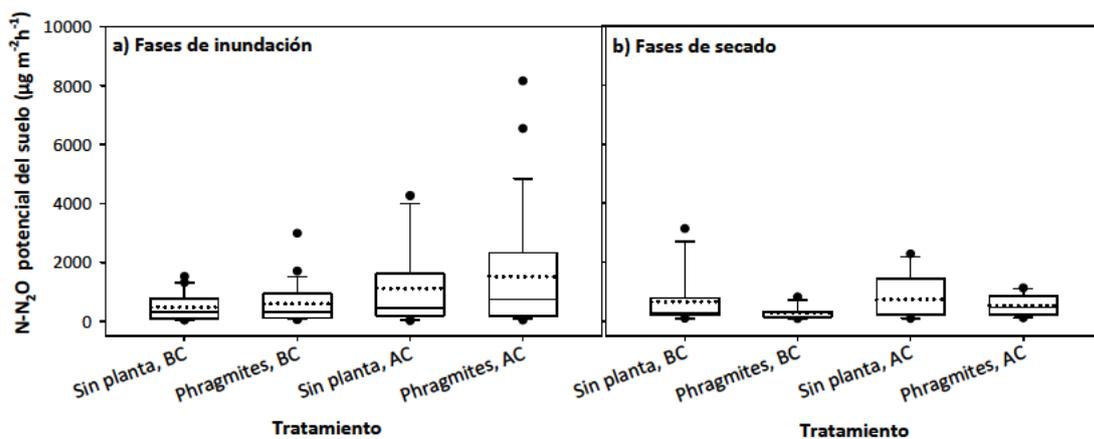


Figura 6.4. Diagrama de cajas y bigotes de las emisiones potenciales de N–N₂O del suelo durante el experimento en los cuatro tratamientos ensayados. La caja incluye los datos situados dentro de los percentiles 25 y 75. Las líneas sólidas dentro de las cajas indican el valor de la mediana y las líneas de puntos la media. Los puntos negros indican los valores atípicos. Las líneas de los “bigotes” indican los datos entre los percentiles 5 y 95. BC: baja carga de nutrientes, 20 mg L⁻¹ NO₃⁻. AC: alta carga de nutrientes, 200 mg L⁻¹ NO₃⁻.

6.4. DISCUSIÓN

6.4.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LAS TRANSFORMACIONES DEL NITRÓGENO (N)

En los horizontes superficiales del suelo, la caída de los valores del potencial redox (Eh) por debajo de $\approx +350$ mV durante las fases de inundación (ver Figura 5.1a del capítulo 5) coincidió con la rápida disminución de las concentraciones de N-NO_3^- en el agua de poro (Figuras 6.1 y 6.2; correlación positiva significativa, $r \geq 0,564$, $p < 0,05$), y con los picos de emisión de N gaseoso ($\text{N-N}_2\text{O}$ potencial del suelo) detectados justo tras la inundación de los mesocosmos (Figura 6.3). Como ya se ha comentado en capítulos anteriores, una bajada del Eh refleja el agotamiento del O_2 por parte de los microorganismos edáficos durante el consumo del carbono (C) orgánico (Unger *et al.*, 2009), lo que conduce a que éstos utilicen otros aceptores de electrones como el NO_3^- , que es reducido en dicho proceso. Esto último concuerda con la disminución de las concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD) hasta valores de ≈ 15 a ≈ 25 mg L^{-1} (ver Figura 5.4 del capítulo 5), independientemente del tratamiento ensayado, y apoya el que la desnitrificación fuese el principal mecanismo implicado en la eliminación del NO_3^- del medio durante los primeros días de inundación de los mesocosmos, independientemente de la presencia de *Phragmites* y de la carga de nutrientes del agua de inundación. Dicho proceso podría haberse visto favorecido por el C orgánico fácilmente disponible (glucosa) suministrado con el agua de inundación, y por el pH del suelo ($\approx 7-8$, Tabla 4.1 del capítulo 4) (Zaman *et al.*, 2012). Los resultados de nuestro experimento concuerdan con los obtenidos por Sakadevan *et al.* (1999), quienes encontraron que la mayor parte del proceso de desnitrificación tuvo lugar en las primeras 24 h tras la adición de NO_3^- a un sistema de sedimento-agua, y con los de González-Alcaraz *et al.* (2012), quienes encontraron una fuerte disminución del N-NO_3^- en el agua de poro (de ≈ 180 a ≈ 20 mg L^{-1}) tan sólo un día después de la inundación de macetas experimentales. Jørgensen *et al.* (2012) también encontraron una rápida disminución de las concentraciones de NO_3^- en el agua de poro y en la disponibilidad de O_2 justo después de eventos de rápida elevación del nivel de agua.

No podemos descartar que las plantas de *Phragmites* contribuyeran, en cierta medida, a reducir las concentraciones de N-NO_3^- en el agua de poro, pero los resultados similares obtenidos en los tratamientos con y sin *Phragmites* señalan que la desnitrificación fue el principal mecanismo implicado. van Oostrom y Russell (1994) indicaron que la eliminación de NO_3^- por absorción de *Phragmites* es bastante baja, y que, salvo que las plantas sean podadas y su biomasa retirada del sistema, la desnitrificación es el principal mecanismo en la eliminación del N de éste. Xue *et al.* (1999) midieron la desnitrificación *in situ* en un humedal artificial y encontraron que $\approx 90\%$ del N-NO_3^- fue desnitrificado mientras que $\approx 10\%$ se almacenó en las plantas del humedal.

Por el contrario, en los horizontes subsuperficiales del suelo, la disminución de las concentraciones de N-NO_3^- en el agua de poro (Figuras 6.1 y 6.2) se correlacionó significativamente con la caída del Eh sólo en los tratamientos sin plantas ($r \geq 0,512$, $p = 0,05$), pero no en presencia de *Phragmites* donde los valores de Eh fueron superiores a $\approx +400$ mV la mayor parte del tiempo (ver Figura 5.1b del capítulo 5). A pesar de que es habitual que los valores de Eh disminuyan en profundidad (Reddy y DeLaune, 2008), la escasa actividad microbiana en los horizontes subsuperficiales arenosos podría haber sido la responsable del bajo consumo de O_2 , lo que explicaría los mayores valores de Eh en comparación con los horizontes superficiales del suelo (Vepraskas y Faulkner, 2001). Además, como ya se ha explicado en el capítulo 5, *Phragmites* tiene la capacidad de suministrar O_2 de los tallos a las raíces a través del aerénquima (Armstrong, 1979; Armstrong *et al.*, 2000; Dickopp *et al.*, 2011) y su sistema de rizomas contribuye a horadar el suelo, favoreciendo la entrada de aire (Hinsinger *et al.*, 2009).

Una disminución más rápida de las concentraciones de N-NO_3^- en el agua de poro de los horizontes subsuperficiales del suelo en presencia de *Phragmites*, justo después de la inundación con agua de baja carga de nutrientes durante las primeras 25 semanas del experimento (Figura 6.1.a2 vs. 6.1.b2), apoya el que las plantas contribuyeran a una eliminación más rápida del NO_3^- durante estas semanas. Este efecto no fue tan evidente a partir de la semana 25 en adelante. Sin embargo, en los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes, la disminución del N-NO_3^- en el

agua de poro fue similar a lo largo del experimento entre los tratamientos con y sin *Phragmites* (Figura 6.2.a2 vs. 6.2.b2). De todos modos, entre las semanas I1 y S29, la concentración de N-NO_3^- en el agua de poro disminuyó un promedio del $83 \pm 6 \%$ durante los cinco primeros días de inundación en los horizontes subsuperficiales de los tratamientos con *Phragmites* y un promedio del $32 \pm 4 \%$ en los tratamientos sin plantas, independientemente de la carga de nutrientes del agua de inundación (Tabla 6.1). Los macrófitos no sólo tienen la capacidad de absorber los nutrientes, sino también de crear un entorno favorable para la retirada de nutrientes (Brix, 1997). La rizosfera proporciona una estructura más favorable para que los microorganismos edáficos se adhieran y realicen los procesos biogeoquímicos implicados en las transformaciones de nutrientes (Caffery y Kemp, 1990). Esto podría haber contribuido a eliminar más rápidamente el N-NO_3^- del agua de poro y a los mayores picos de emisiones potenciales de N-NO_2 del suelo en presencia de *Phragmites*.

Sin embargo, entre las semanas I30–S44, las concentraciones de N-NO_3^- en el agua de poro no disminuyeron en profundidad tras cinco días de inundación, independientemente de la presencia de *Phragmites* y de la carga de nutrientes del agua. En nuestro experimento se observó una mayor actividad fisiológica de las plantas de *Phragmites* (Figura 5.8 del capítulo 5), junto con una mayor actividad microbiana en el suelo (Figura 5.7 del capítulo 5), durante las 25 primeras semanas, más cálidas, del experimento (para más información ver capítulo 5). Esto podría haber contribuido a una retirada más intensa del N-NO_3^- en los horizontes subsuperficiales arenosos, sobre todo en presencia de agua de baja carga de nutrientes, mientras que la disminución de tales actividades a partir de dicha semana en adelante, debido a la caída de la temperatura, podría haber dificultado tales efectos favorables.

De manera diferente al N-NO_3^- , las concentraciones de N-NH_4^+ en el agua de poro aumentaron progresivamente al disminuir el Eh (correlación negativa significativa Eh vs. N-NH_4^+ ; $r \leq -0,414$, $p = 0,05$). Como ya se ha comentado en capítulos anteriores, cuando los microorganismos consumen la materia orgánica, el primer paso en la mineralización del N es la transformación del N-orgánico en NH_4^+ (amonificación), que puede tener lugar tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos (Reddy y DeLaune,

2008). Bajo condiciones óxicas ($E_h > \approx +350$ mV a $pH \approx 7$ según Otero y Macías, 2003) el NH_4^+ se oxida a NO_3^- a través del proceso de nitrificación (Reddy y DeLaune, 2008). Sin embargo, cuando el O_2 desaparece o su concentración cae por debajo del 4 % ($E_h < \approx +350$ mV a $pH \approx 7$ según Otero y Macías, 2003), el NH_4^+ no se nitrifica y su concentración aumenta en el agua de poro del suelo. Incluso si el proceso de volatilización del NH_4^+ hubiera ocurrido debido a un pH del suelo > 7 (Reddy y DeLaune, 2008), el $N-NH_4^+$ se acumuló durante las fases de inundación. Esto podría deberse al mencionado proceso de amonificación durante la mineralización de la materia orgánica bajo condiciones anóxicas. Dalsgaard y Thamdrup (2002) también encontraron que la adición de materia orgánica condujo a un aumento de la concentración de NH_4^+ por mineralización en un experimento con sedimentos marinos. Además de la vía anterior, también pudo tener lugar la reducción desasimilatoria del NO_3^- a NH_4^+ (DNRA; Tiedje, 1998; Nizzoli *et al.*, 2010; Sgouridis *et al.*, 2011; Bernard *et al.*, 2015; Brin *et al.*, 2015). La DNRA es un mecanismo para la eliminación del NO_3^- en ambientes con alto contenido en C orgánico y bajas concentraciones de NO_3^- (Ma y Aelion, 2005; Lind *et al.*, 2013), a valores de $E_h < 0$ mV (Ma y Aelion, 2005; Reddy y DeLaune, 2008). Aunque algunos estudios han indicado que la contribución de la DNRA a las concentraciones de NH_4^+ es pequeña, en relación al producido a partir de la descomposición de la materia orgánica (Giblin *et al.*, 2013 y referencias citadas en ese documento; Bernard *et al.*, 2015), este proceso pudo cobrar importancia hacia el final de las fases de inundación, favorecido por la disminución de la ratio NO_3^-/COD (el NO_3^- disminuyó fuertemente pero el COD se mantuvo a concentraciones de $\approx 15-20$ mg L^{-1} ; Dalsgaard y Thamdrup, 2002). La existencia de condiciones adecuadas para la sulfato-reducción (tal y como muestran los valores de $E_h < 0$ mV) también podrían haber favorecido la DNRA, ya que el sulfuro puede inhibir el proceso de desnitrificación (Brunet y García-Gil, 1996; An y Gardner, 2002; Aelion y Warttinger, 2010). Las concentraciones de $N-NO_3^-$ y $N-NH_4^+$ en el agua de poro al comienzo de las fases de inundación en los tratamientos de alta carga de nutrientes fueron más altas que las correspondientes concentraciones en el agua de inundación (Figura 6.2), probablemente debido a la contribución del N remanente acumulado en el suelo (Reddy y DeLaune, 2008). En nuestro experimento, las concentraciones de $N-NO_3^-$ en el agua de poro se incrementaron durante las fases de secado mientras que las de $N-$

NH_4^+ disminuyeron (Figuras 6.1 y 6.2), lo que encaja con la nitrificación del NH_4^+ acumulado durante las fases de inundación (Reddy y DeLaune, 2008). Esto último está apoyado por la correlación negativa significativa entre N-NO_3^- y N-NH_4^+ ($r \leq -0,420$, $p < 0,05$) y los porcentajes máximos de N-NH_4^+ y mínimos de N-NO_3^- en el agua de poro hacia el final de cada fase de inundación (Figuras 6.5 y 6.6). La nitrificación–desnitrificación son procesos interconectados (Reddy y DeLaune, 2008), por lo que el NO_3^- formado durante las fases de secado fue una fuente para las emisiones potenciales de N_2O , tal y como se discute más adelante.

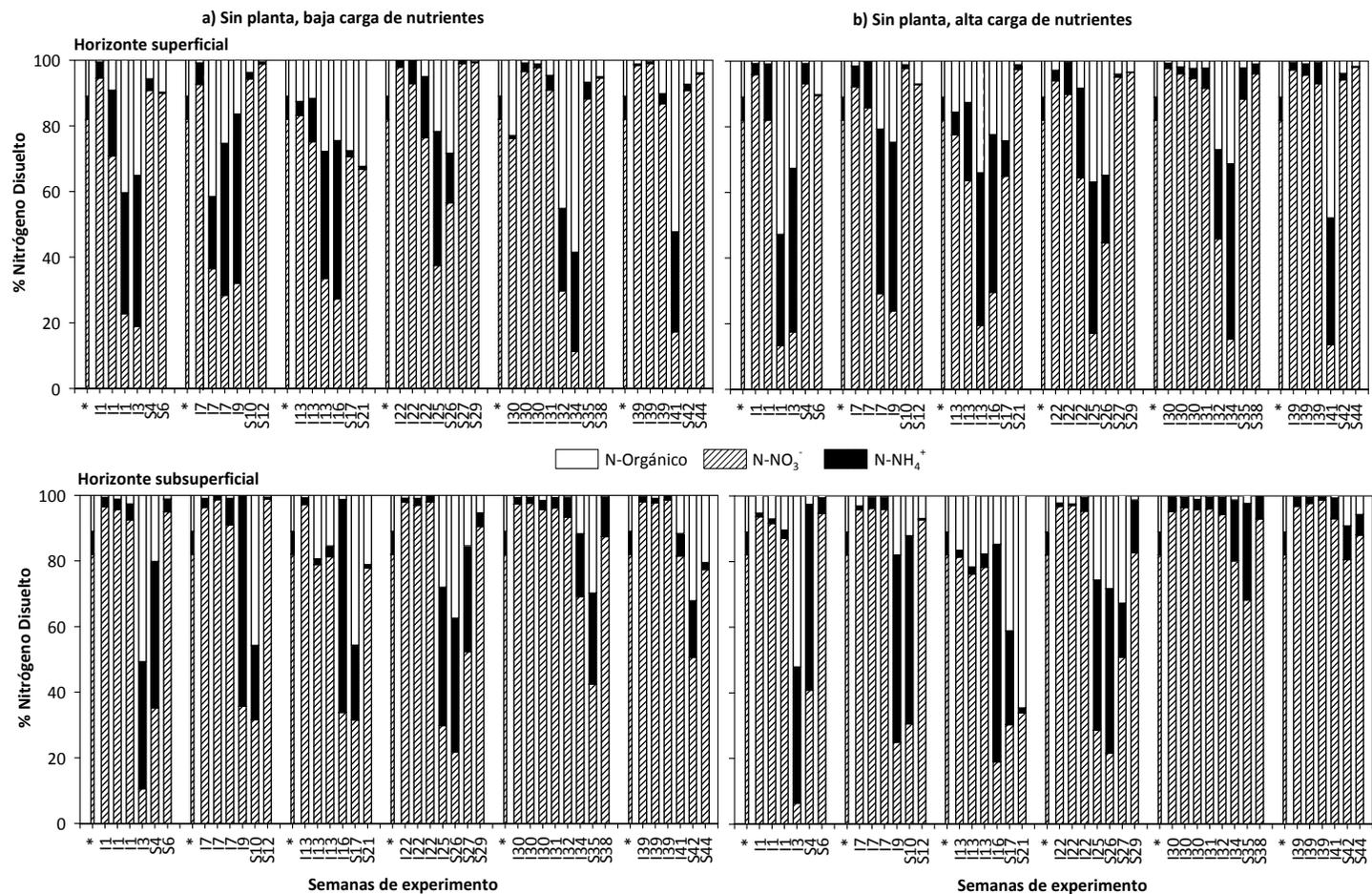


Figura 6.5. Porcentaje de nitrógeno orgánico (N-Organico), N-NO₃⁻ y N-NH₄⁺ en el agua de poro de los tratamientos sin plantas. Con una I se hace referencia a las fases de inundación y con una S a las de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I22 fue la semana 22 del experimento que perteneció a la cuarta fase de inundación; S35 fue la semana 35 del experimento que perteneció a la quinta fase de secado). Con un asterisco (*) se designa a la adición de agua eutrofizada al inicio de cada fase de inundación. Baja carga de nutrientes: 20 mg L⁻¹ NO₃⁻. Alta carga de nutrientes: 200 mg L⁻¹ NO₃⁻.

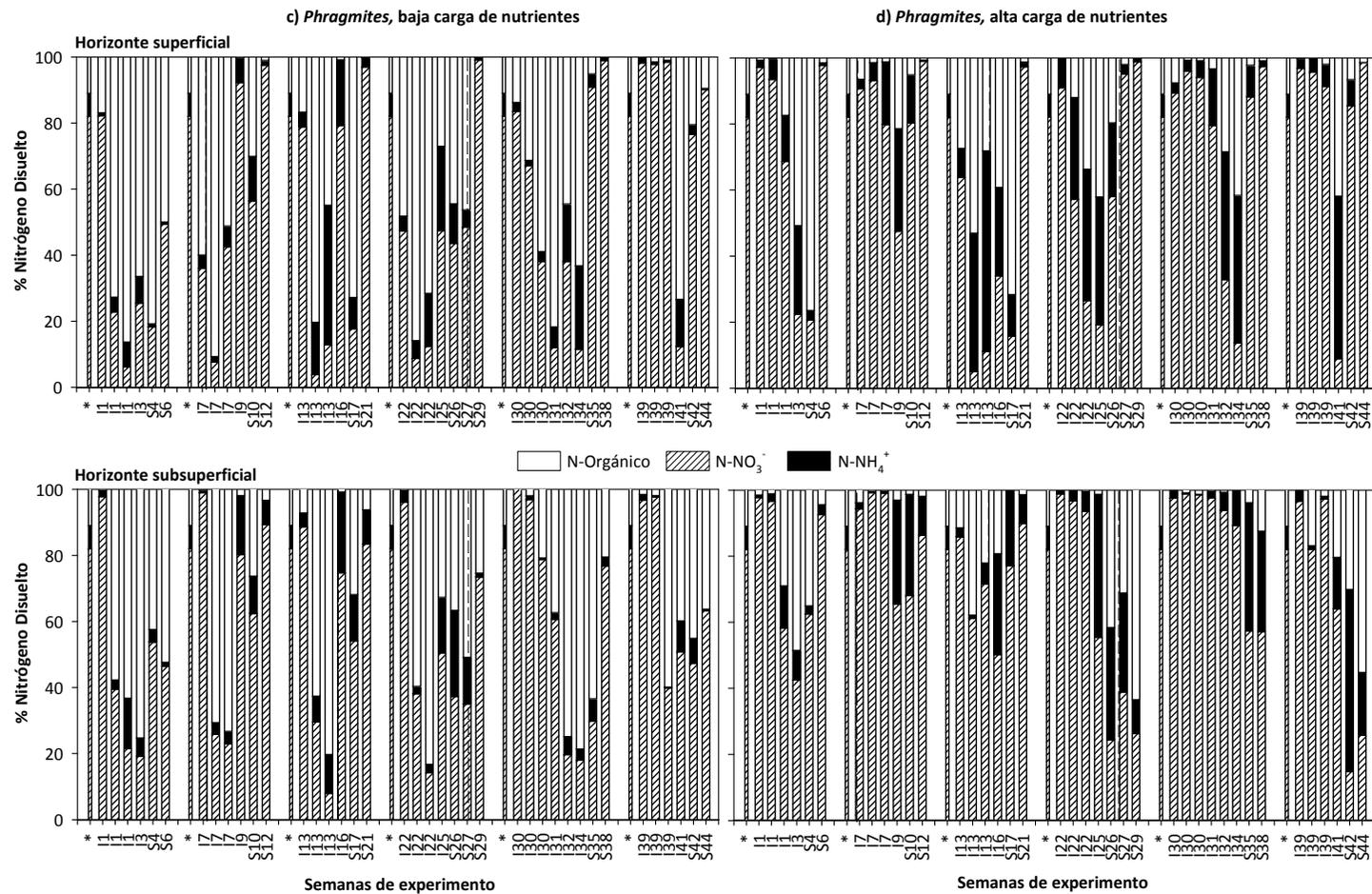


Figura 6.6. Porcentaje de nitrógeno orgánico (N–Orgánico), N–NO₃⁻ y N–NH₄⁺ en el agua de poro de los tratamientos con *Phragmites*. Con una I se hace referencia a las fases de inundación y con una S a las de secado. En el eje de abscisas, los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I22 fue la semana 22 del experimento que perteneció a la cuarta fase de inundación; S35 fue la semana 35 del experimento que perteneció a la quinta fase de secado). Con un asterisco (*) se designa a la adición de agua eutrofizada al inicio de cada fase de inundación. Baja carga de nutrientes: 20 mg L⁻¹ NO₃⁻. Alta carga de nutrientes: 200 mg L⁻¹ NO₃⁻.

6.4.2. EFICACIA EN LA ELIMINACIÓN DE N-NO₃⁻, EMISIONES POTENCIALES DE N-N₂O DEL SUELO Y GESTIÓN DEL SALADAR

Los resultados en relación al agua de los drenajes indicaron que todos los tratamientos ensayados fueron altamente eficaces en la eliminación del N-NO₃⁻, después de tres–cuatro semanas de inundación (Tabla 6.1). Dado que las concentraciones de N-NO₃⁻ en el agua de drenaje fueron similares en todos los tratamientos ensayados ($\approx 1 \text{ mg L}^{-1}$), la eficacia con respecto a la concentración añadida fue mayor en los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes que en los de baja carga de nutrientes (98 % vs. 85 %; Tabla 6.1), independientemente de la presencia de *Phragmites*.

Cuando el porcentaje de reducción del N-NO₃⁻ en el agua de poro, para cada horizonte de suelo, se analizó por separado para las semanas I1 a S29 e I30 a S44, los resultados revelaron las diferencias en cuanto al comportamiento del sistema suelo–planta (Tabla 6.1). Los horizontes superficiales del suelo fueron más eficientes en la eliminación del N-NO₃⁻ durante las primeras 29 semanas del experimento ($\approx 90 \%$, I1–S29) que durante las últimas 14 semanas ($\approx 40\text{–}50 \%$, I30–S44). Este hallazgo apoya nuestras consideraciones anteriores en relación a una mayor actividad microbiana durante los meses más cálidos del experimento. En concordancia con los altos valores del Eh, la eliminación del N-NO₃⁻ en el agua de poro de los horizontes subsuperficiales del suelo fue escasa en ausencia de plantas ($\approx 30\text{–}35 \%$; Tabla 6.1), pero aumentó hasta $\approx 70\text{–}90 \%$ en los tratamientos con *Phragmites* entre las semanas I1–S29 (Tabla 6.1). Sin embargo, esta alta eficiencia disminuyó drásticamente en el período más frío del año (semanas I30 a S44, ver Figura 5.3 del capítulo 5) en el que las plantas de *Phragmites* estuvieron inactivas (para más detalles ver capítulo 5). Esto último pone de manifiesto el papel de las plantas de *Phragmites* para aumentar la eficiencia en la retirada del N-NO₃⁻ del sistema cuando éstas se encuentran fisiológicamente más activas.

El buen funcionamiento de los mesocosmos experimentales para depurar el agua eutrofizada de inundación concuerda con los datos de campo, que indicaron que el saladar de la Marina del Carmolí contribuye activamente a reducir los aportes de NO₃⁻

a la laguna del Mar Menor. Álvarez-Rogel *et al.* (2006) encontraron concentraciones que alcanzaron $\approx 45 \text{ mg L}^{-1}$ de N-NO_3^- ($\approx 200 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$) en la Rambla del Albuñón, que desemboca directamente en la laguna del Mar Menor. Los mismos autores encontraron concentraciones $\approx 56 \text{ mg L}^{-1}$ de N-NO_3^- ($\approx 250 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$) en la Rambla de Miranda antes de atravesar la Marina del Carmolí, concentración que se redujo en un $\approx 98 \%$, después de que el agua fluyera a través de una densa población de *Phragmites* antes de llegar a la laguna. González-Alcaraz *et al.* (2012) señalaron un total de $78,3 \text{ T año}^{-1}$ de N (85 % de N-NO_3^-) descargados en la Marina del Carmolí entre septiembre de 2005 y noviembre de 2006. El problema continúa hoy en día, como se muestra por las concentraciones de $\approx 250\text{--}350 \text{ mg L}^{-1}$ de NO_3^- en muestras de agua recogidas en los mismos cursos de agua durante 2015 y 2016 (datos no publicados). Por lo tanto, está claro el efecto beneficioso de este saladar en la reducción del grado de eutrofización de la laguna del Mar Menor.

Los datos de nuestro experimento señalan que la desnitrificación fue el proceso principal en la eliminación del N-NO_3^- , lo que implicó emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ desde el suelo. Sin embargo, ciertas cantidades de N_2O también pudieron ser liberadas a la atmósfera como un subproducto de los procesos de nitrificación y de la DNRA (Giles *et al.*, 2012; Sánchez-García *et al.*, 2014). No obstante, y dado que no se midió el ratio $\text{N}_2:\text{N}_2\text{O}$ en las muestras de aire tomadas, no podemos evaluar de manera más realista la contribución de suelo del saladar a las emisiones de N_2O . Reddy y DeLaune (2008) indicaron que esta ratio varía en gran medida durante la desnitrificación, desde 100:1 a $< 10:1$, con ratios más altas en suelos con alto contenido en C y ratios más bajas en suelos con bajo contenido en C. Otros investigadores (por ejemplo, Aelion y Engle, 2010) puntualizaron que los humedales eutrofizados tienen más activos los procesos de desnitrificación y del ciclo del N que los no eutrofizados, lo que conduce a una mayor producción de N_2O . Un aumento en la biomasa microbiana (Groffman, 1994) y/o alteraciones en la composición de la comunidad microbiana (Wallenstein *et al.*, 2006) han sido citados como factores que contribuyen a provocar mayores emisiones.

En cuanto a la influencia de la vegetación en las emisiones de N_2O , Wang *et al.* (2008) encontraron que ésta favorece una mayor actividad biogeoquímica durante las estaciones de crecimiento, lo que resulta en flujos más grandes de N_2O a la atmósfera y Yang *et al.* (2012) señalaron que la presencia de plantas de *Phragmites* estimuló las emisiones de N_2O en un lago somero. Sin embargo, estos estudios no consideraron las emisiones directas de N_2O procedentes de las plantas como sí lo hicieron Jørgensen *et al.* (2012). Estos autores demostraron que las plantas pueden contribuir activamente a las emisiones de gas a través del transporte desde la zona de la raíz a la atmósfera. Por lo tanto, estimaciones como la nuestra que sólo consideran las emisiones del suelo podrían subestimar el flujo neto del ecosistema.

En nuestro experimento, los datos indicaron que los tratamientos con *Phragmites* tendían a mostrar mayores picos de producción potencial de $N-N_2O$ desde el suelo durante las fases de inundación (Figura 6.3) A pesar de esto, el papel de las plantas fue más evidente durante las fases de secado, cuando éstas contribuyeron a reducir las emisiones potenciales de $N-N_2O$, principalmente en el tratamiento con agua de baja carga de nutrientes (Figura 6.4.b). Por lo tanto, esto implicaría que las plantas influyeron de forma diferente en las emisiones en función de las condiciones de inundación del suelo. Cuando éste está inundado, la absorción de $N-NO_3^-$ por las plantas de *Phragmites* sería inferior, mientras que durante las fases de secado la absorción del agua de poro se estimularía (Blum, 2011), disminuyendo por tanto la cantidad de $N-NO_3^-$ disponible para el proceso de desnitrificación.

Nuestros resultados también pueden contribuir a la gestión de los carrizales, que se controlan generalmente a través de podas. Ruiz y Velasco (2010) propusieron el uso de *Phragmites* para reducir el enriquecimiento de nutrientes en la laguna del Mar Menor. Estos autores recomendaron el inicio del periodo estival (junio-julio), la estación más seca en la zona, como período para la poda, coincidiendo con el momento de máxima biomasa aérea, mayor acumulación de nutrientes y menor humedad en los cursos de agua. Nosotros no hemos testado los efectos de la poda, pero nuestros resultados sobre la influencia de *Phragmites* en la eliminación de $N-NO_3^-$ sugieren que la propuesta puede ser adecuada, pero con una consideración. Si la

principal contribución de *Phragmites* en la absorción de N-NO_3^- , y en la reducción de las emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo, se produjo al comienzo de las fases de secado, se debería de considerar un lapso de tiempo al comienzo del verano antes de podar las plantas, una vez que los cursos de agua estén secos. Durante este período *Phragmites* contribuiría de manera más activa para reducir la concentración de N-NO_3^- en el agua de poro.

6.5. CONCLUSIONES

Los fuertes cambios del Eh durante el experimento indicaron una intensa actividad microbiana, vinculada con la dinámica de las formas de N. Tanto la amonificación como la DNRA pudieron contribuir a la acumulación de N-NH_4^+ en el agua de poro durante las fases en las cuales se inundaron los mesocosmos. Los resultados indicaron que la desnitrificación fue el proceso principal implicado en la eliminación de N-NO_3^- en los horizontes superficiales del suelo, independientemente de la presencia de *Phragmites* y del periodo del año. Sin embargo, en los horizontes subsuperficiales del suelo, las plantas de *Phragmites* contribuyeron a una eliminación más rápida del N-NO_3^- durante los meses más cálidos del experimento. Durante las fases de secado, cuando el N-NH_4^+ previamente acumulado fue nitrificado, las plantas fueron un factor clave para mantener las concentraciones de N-NO_3^- en el agua de poro más bajas, contribuyendo a disminuir el sustrato disponible para la desnitrificación, resultando en menores emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo.

Las tasas de emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo encontradas en este estudio indican que los procesos de desnitrificación en los saladares costeros de la laguna del Mar Menor contribuyen activamente a la retirada anual del N-NO_3^- que fluye desde zonas agrícolas, reduciendo fuertemente la eutrofización de la laguna. Por lo tanto, se debe considerar que los aspectos positivos de la depuración de las aguas de los humedales podrían contrarrestar los aspectos negativos relacionados con las emisiones potenciales de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo a la atmósfera. Nuestros datos también indican que la poda de *Phragmites* al comienzo del período de verano puede ser una opción de manejo adecuada, pero tras un lapso de tiempo determinado para permitir

la absorción de N-NO_3^- por las plantas antes del secado completo de los cursos de agua.

6.6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL2010–20214). La Dra. M. Nazaret González Alcaraz agradece a la Fundación Ramón Areces por la financiación de la beca post–doctoral en el Department of Ecological Science, Faculty of Earth and Life Sciences, Vrije Universiteit, Amsterdam (Holanda). El Dr. Héctor M. Conesa Alcaraz agradece al Ministerio de Economía y Competitividad y a la Universidad Politécnica de Cartagena por la financiación a través del programa "Ramón y Cajal" (Ref. RYC–2010–05665).

6.7. BIBLIOGRAFÍA

- Aelion, C., Warttinger, U. 2010. Sulfide inhibition of nitrate removal in coastal sediments. *Estuaries and Coasts*, 33: 798–803.
- Aelion, C.M., Engle, M.R. 2010. Evidence for acclimation of N cycling to episodic N inputs in anthropogenically–affected intertidal salt marsh sediments. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 1006–1008.
- Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F.J., Egea-Nicolás, C. 2006. Phosphorus and nitrogen content in the water of a coastal wetland in the Mar Menor lagoon (SE Spain): relationships with effluents from urban and agricultural areas. *Water, Air and Soil Pollution*, 173: 21–38.
- An, S.M., Gardner, W.S. 2002. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) as a nitrogen link, versus denitrification as a sink in a shallow estuary (Laguna Madre/Baffin Bay, Texas). *Marine Ecology–Progress Series*, 237: 41–50.

- Armstrong, W. 1979. Aeration in higher plants. *Advances in Botanical Research*, 7: 225–232.
- Armstrong, W., Cousins, D., Armstrong, J., Turner, D.W., Beckett, P.M. 2000. Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas–exchange with the rhizosphere: a microelectrode study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany*, 86: 687–703.
- Audet, J., Elsgaard, L., Kjaergaard, C., Larsen, S.E., Hoffmann, C.C. 2013. Greenhouse gas emissions from a Danish riparian wetland before and after restoration. *Ecological Engineering*, 57: 170–182.
- Audet, J., Hoffmann, C.C., Andersen, P.M., Baattrup-Pedersen, A., Johansen, J.R., Larsen, S.E., Elsgaard, L. 2014. Nitrous oxide fluxes in undisturbed riparian wetlands located in agricultural catchments: Emission, uptake and controlling factors. *Soil Biology and Biochemistry*, 68: 291–299.
- Bernard, R.J., Mortazavi, B., Kleinhuizen, A.A. 2015. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) seasonally dominates NO_3^- reduction pathways in an anthropogenically impacted sub-tropical coastal lagoon. *Biogeochemistry*, 125: 47–64.
- Blum, A. 2011. *Plant Breeding for Water–Limited Environments*. Springer Publishing, New York, EEUU. 249 pp.
- Brin, L.D., Giblin, A.E., Rich, J.J. 2015. Effects of experimental warming and carbon addition on nitrate reduction and respiration in coastal sediments. *Biogeochemistry*, 125: 81–95.
- Brix, H. 1997. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands. *Water Science and Technology*, 35: 11–17.

- Brunet, R.C., García-Gil, L.J. 1996. Sulfide-induced dissimilatory nitrate reduction to ammonia in anaerobic freshwater sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 21: 131–138.
- Caffery, J.M., Kemp, W.M. 1990. Nitrogen cycling in sediments with estuarine populations of *Potamogeton perfoliatus* and *Zostera marina* Marine. *Ecology–Progress Series*, 66: 147–160.
- Dalsgaard, T., Thamdrup, B. 2002. Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3802–3808.
- Di, H.J., Cameron, K.C. 2002. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: Sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 64: 237–256.
- Dickopp, J., Kazda, M., Cízková, H. 2011. Differences in rhizome aeration of *Phragmites australis* in a constructed wetland. *Ecological Engineering*, 37: 1647–1653.
- Giblin, A.E., Tobias, C.R., Song, B., Weston, N., Banta, G.T., Rivera-Monroy, V.H. 2013. The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems. *Oceanography*, 26: 124–131.
- Giles, M.E., Morley, N.J., Baggs, E.M., Daniell, T.J. 2012. Soil nitrate reducing processes—drivers, mechanisms for spatial variation and significance for nitrous oxide production. *Frontiers in Microbiology*, 3: 407.
- González-Alcaraz, M.N., Egea, C., Jiménez-Cárceles, F.J., Párraga-Aguado, I., María-Cervantes, A., Delgado, M.J., Álvarez-Rogel, J. 2012. Storage of organic carbon, nitrogen and phosphorus in the soil–plant system of *Phragmites australis* stands from a eutrophicated Mediterranean salt marsh. *Geoderma*, 185–186: 61–72.

- Groffman, P.M. 1994. Denitrification in freshwater wetlands. *Current Topics in Wetland Biogeochemistry*, 1: 15–35.
- Hefting, M.M., Bobbink, R., de Caluwe, H. 2003. Nitrous oxide emission and denitrification in chronically nitrate-loaded riparian buffer zones. *Journal of Environmental Quality*, 32: 1194–1203.
- Hefting, M.M., van den Heuvel, R.N., Verhoeven, J.T.A. 2013. Wetlands in agricultural landscapes for nitrogen attenuation and biodiversity enhancement: opportunities and limitations. *Ecological Engineering*, 56: 5–13.
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M. 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, 321: 117–152.
- Hoffmann, C.C., Heiberg, L., Audet, J., Schønfeldt, B., Fuglsang, A., Kronvang, B., Ovesen, N.B., Kjaergaard, C., Hansen, H.C.B., Jensen, H.S. 2012. Low phosphorus release but high nitrogen removal in two restored riparian wetlands inundated with agricultural drainage water. *Ecological Engineering*, 46: 75–87.
- IPCC, 2007. Climate Change 2007: the Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment. Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ip, Y.K., Chew, S.F., Randall, D.J. 2001. Ammonia toxicity, tolerance, and excretion. *Fish Physiology*, 20: 109–148.
- Jacobs, A.E., Harrison, J.A. 2014. Effects of floating vegetation on denitrification, nitrogen retention, and greenhouse gas production in wetland microcosms. *Biogeochemistry*, 119: 51–66.

- Jørgensen, C.J., Struwe, S., Elberling, B. 2012. Temporal trends in N₂O flux dynamics in a Danish wetland—effects of plant-mediated gas transport of N₂O and O₂ following changes in water level and soil mineral–N availability. *Global Change Biology*, 18: 210–222.
- Lind, L.P.D., Audet, J., Tonderski, K., Hoffmann, C.C. 2013. Nitrate removal capacity and nitrous oxide production in soil profiles of nitrogen loaded riparian wetlands inferred by laboratory microcosms. *Soil Biology and Biochemistry*, 60: 156–164.
- Ma, W.K., Bedard-Haughn, A., Siciliano, S.D., Farrell, R.E. 2008. Relationship between nitrifier and denitrifier community composition and abundance in predicting nitrous oxide emissions from ephemeral wetland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1114–1123.
- Ma, H., Aelion, C.M. 2005. Ammonium production during microbial nitrate removal in soil microcosms from a developing marsh estuary. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1869–1878.
- Mander, Ü., Dotro, G., Ebie, Y., Towprayoon, S., Chiemchaisri, C., Nogueira, S.F., Jamsranjav, B., Kasak, K., Truu, J., Tournebize, J., Mitsch, W.J. 2014. Greenhouse gas emission in constructed wetlands for wastewater treatment: A review. *Ecological Engineering*, 66: 19–35.
- Moseman-Valtierra, S., Gonzalez, R., Kroeger, K.D., Tang, J., Chao, W.C., Crusius, J., Bratton, J., Green, A., Shelton, J. 2011. Short-term nitrogen additions can shift a coastal wetland from a sink to a source of N₂O. *Atmospheric Environment*, 45: 4390–4397.
- Moss, B. 2008. Water pollution by agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363: 659–666.

- Nizzoli, D., Carraro, E., Nigro, V., Viaroli, P. 2010. Effect of organic enrichment and thermal regime on denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in hypolimnetic sediments of two lowland lakes. *Water Research*, 44: 2715–2724.
- Otero, X.L., Macías, F. 2003. Spatial variation in pyritization of trace metals in saltmarsh soils. *Biogeochemistry*, 62: 59–86.
- Picek, T., Cizkova, H., Dusek, J. 2007. Greenhouse gas emissions from a constructed wetland—plants as important sources of carbon. *Ecological Engineering*, 31: 98–106.
- Reddy, K.R., DeLaune, R.D. 2008. *Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications*, first ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. 757 pp.
- Robertson, G.P., Bruulsema, T.W., Gehl, R.J., Kanter, D., Mauzerall, D.L., Rotz, C.A., Williams, C.O. 2013. Nitrogen–climate interactions in US agriculture. *Biogeochemistry*, 114: 4170.
- Ruiz, M., Velasco, J. 2010. Nutrient bioaccumulation in *Phragmites australis*: management tool for reduction of pollution in the Mar Menor. *Water, Air and Soil Pollution*, 205: 73–185.
- Saeed, T., Sun, G. 2012. A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. *Journal of Environmental Management*, 112: 429–448.
- Sakadevan, K., Bavor, H.J. 1999. Nutrient removal mechanisms in constructed wetlands and sustainable water management. *Water Science and Technology*, 40: 121–128.

- Sánchez-García, M., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., Cayuela, M.L. 2014. Biochar increases soil N₂O emissions produced by nitrification-mediated pathways. *Frontiers in Environmental Science*, 2: 1–10.
- Sgouridis, F., Heppell, C.M., Wharton, G., Lansdown, K., Trimmer, M. 2011. Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in a temperate re-connected floodplain. *Water Research*, 45: 4909–4922.
- SPSS Inc. 2006. Manual del usuario del SPSS Base 15.0. SPSS Inc, Chicago, EEUU.
- Tiedje, J.M. 1998. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. En: Zehnder, A.J.B. (Ed.), *Environmental Microbiology of Anaerobes*. John Wiley and Sons, New York, EEUU. pp. 179–244.
- Unger, I.M., Kennedy, A.C., Muzika, R.M. 2009. Flooding effects on soil microbial communities. *Applied Geochemistry*, 42: 1–8.
- van Oostrom, A.J., Russell, J.M. 1994. Denitrification in constructed wetlands receiving high concentrations of nitrate. *Water Science and Technology*, 29: 7–14.
- Vepraskas, M.J., Faulkner, S.P. 2001. Redox chemistry of hydric soils. En: Richardson, J.L., Vepraskas, M.J. (Eds.), *Wetland Soils. Genesis, Hydrology, Landscapes and Classification*. Lewis Publishers, Florida, EEUU. pp. 85–106.
- Vymazal, J. 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 380: 48–65.
- Wallenstein, M.D., Myrold, D.D., Firestone, M., Voytek, M. 2006. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological Applications*, 16: 2143–2152.

- Wang, Y., Inamori, R., Kong, H., Xu, K., Inamori, Y., Kondo, T., Zhang, J. 2008. Nitrous oxide emission from polyculture constructed wetlands: Effect of plant species. *Environmental Pollution*, 152: 351–360.
- Xue, Y., Kovacic, D.A., David, M.B., Gentry, L.E., Mulvaney, R.L., Lindau, C.W. 1999. In situ measurements of denitrification in constructed wetlands. *Journal of Environmental Quality*, 28: 263–269.
- Yang, Z., Zhao, Y., Xia, X. 2012. Nitrous oxide emissions from *Phragmites australis*-dominated zones in a shallow lake. *Environmental Pollution*, 166: 116–124.
- Zaman, M., Nguyen, M.L., Šimek, M., Nawaz, S., Khan, M.J., Babar, M.N., Zaman, S. 2012. Emissions of Nitrous Oxide (N₂O) and Di-Nitrogen (N₂) from the Agricultural Landscapes, Sources, Sinks, and Factors Affecting N₂O and N₂ Ratios. En: Guoxiang, L. (Ed.), *Greenhouse Gases—Emission, Measurement and Management*, ISBN: 978–953–51–0323–3, InTech, DOI: 10.5772/32781. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/greenhouse-gases-emission-measurement-and-management/emissions-of-nitrous-oxide-n2o-and-di-nitrogen-n2-from-agricultural-landscape-sources-sinks-and-fact>.

CAPÍTULO 7

Dinámica del fósforo

Phosphorus retention and fractionation in an eutrophic wetland: a one-year mesocosms experiment under fluctuating flooding conditions.

(Retención y fraccionamiento de fósforo en un humedal eutrofizado: un experimento anual en mesocosmos bajo condiciones de inundación fluctuantes).

Tercero, M.C., Álvarez-Rogel, J., Conesa, H.M., Párraga-Aguado, I., González-Alcaraz, M.N.

Journal of Environmental Management (en revisión)

RESUMEN

El objetivo específico de esta parte del trabajo fue evaluar la capacidad de retención de P y determinar si dicha retención está condicionada por la carga de nutrientes, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año, y determinar la contribución de los diferentes componentes del suelo, así como de *Phragmites*, en la retención de P. Para ello, durante un año, se llevó a cabo un experimento en mesocosmos con perfiles simulados de suelo (horizonte superficial de textura fina y horizonte subsuperficial arenoso) de un saladar costero de la laguna del Mar Menor, bajo condiciones alternantes de inundación–secado con agua eutrofizada de baja (6 mg L^{-1} de PO_4^{3-} - $1,95 \text{ mg L}^{-1}$ P- PO_4^{3-}) y alta (60 mg L^{-1} de PO_4^{3-} - $19,5 \text{ mg L}^{-1}$ P- PO_4^{3-}) carga de P, y con la presencia/ausencia de *Phragmites*. Durante este tiempo se midieron regularmente las concentraciones de PO_4^{3-} en el agua de poro del suelo y en el agua de drenaje, y se analizó el P acumulado en los suelos (incluyendo un procedimiento de fraccionamiento) y las plantas (raíces, rizomas, tallos y hojas). Los mesocosmos experimentales fueron altamente eficaces en la retirada del P del agua eutrofizada de inundación (reducción del P añadido al sistema $> 90 \%$ tanto en el agua de poro del suelo como en el agua de drenaje), independientemente de la carga de nutrientes, el periodo del año y la presencia/ausencia de *Phragmites*. El suelo fue el principal sumidero del P añadido al sistema, mientras que *Phragmites* tuvo un papel minoritario. La biomasa de *Phragmites* acumuló $\approx 27 \%$ del P añadido con el agua de inundación en el tratamiento de baja carga de P, mientras que $\approx 12 \%$ de P en el de alta carga de P. Los rizomas fueron los órganos que más contribuyeron a la acumulación de P por *Phragmites* ($\approx 67\text{--}72 \%$ del P total retenido por las plantas). Los compuestos de Ca/Mg fueron los principales contribuyentes en la retención de P por el suelo, especialmente en los horizontes superficiales de textura fina ($\approx 34\text{--}53 \%$ del P total en el suelo estaba presente en esta fracción). Las plantas de *Phragmites* favorecieron la retención de P en los óxidos metálicos del suelo (aumento $\approx 12 \%$ del P retenido en la fracción de óxidos metálicos en el tratamiento con agua de alta carga de P). Por lo tanto, se recomienda el uso de humedales para aminorar los impactos negativos de las aguas enriquecidas en P en la laguna del Mar Menor y áreas similares. Se aconseja la incorporación de materiales carbonatados de textura fina, y el uso de *Phragmites* para favorecer la retención de P por estos sistemas.

Palabras clave: *Phragmites australis*; Filtros verdes; Laguna del Mar Menor; Dinámica del fósforo; Ciclos de inundación–secado.

7.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO ESPECÍFICO

Los territorios con actividades agrícolas, urbanas y/o industriales de carácter intensivo son susceptibles de sufrir problemas de eutrofización, debido al uso masivo de fertilizantes y a la alta producción de aguas residuales (Di y Cameron, 2002; Robertson *et al.*, 2013). Aunque los humedales son propensos a recibir el agua y los sedimentos contaminados de las zonas circundantes, estos sistemas tienen la capacidad de transformar y/o eliminar compuestos nocivos (por ejemplo, nutrientes), actuando como filtros verdes (Mitsch y Gosselink, 2007; Zhang *et al.*, 2014). En este sentido, los humedales son considerados sistemas respetuosos con el medio ambiente, adecuados para mejorar la calidad del agua de fuentes puntuales y difusas en cuencas con uso intensivo (Cooper, 2009; Tournebize *et al.*, 2016). Particularmente, es ampliamente conocido que los suelos de los humedales actúan como sumideros de fósforo (P), contribuyendo a reducir la concentración de este nutriente del agua que fluye a través de ellos (Wang y Li, 2010; González-Alcaraz *et al.*, 2012a; Canga *et al.*, 2016). Dicha capacidad para eliminar P del agua está influenciada por diversos procesos tales como los de sorción, precipitación y absorción por las plantas (Vymazal, 2007). Machado *et al.* (2016 y referencias allí citadas) resaltaron las características del sustrato como aspecto clave en la retención del P.

Entre el 80 y 90 % del P en humedales se almacena en el suelo (Vepraskas y Faulkner, 2001), siendo los principales componentes implicados la materia orgánica, los compuestos de calcio (Ca) y magnesio (Mg) y los óxidos e hidróxidos metálicos (Reddy y DeLaune, 2008). La retención del P en el suelo está controlada principalmente por las características físico-químicas del medio edáfico (por ejemplo, pH, potencial redox -Eh-, mineralogía, materia orgánica, contenido en arcilla, compuestos de Ca, óxidos metálicos, etc.), aunque otros factores tales como la vegetación, la profundidad de la lámina de agua, el tiempo de retención hidráulica y las fluctuaciones del régimen de inundación pueden influir (Reddy *et al.*, 1999). La unión del P a compuestos de Ca es el principal proceso de retención en suelos/sedimentos de pH alto (Vohla *et al.*, 2011), mientras que los compuestos de Fe y Al adquieren mayor importancia en medios más ácidos (Verhoeven *et al.*, 1999). Sin embargo, y bajo determinadas

situaciones, los humedales pueden transformarse de sumideros a fuentes de P, debido a los procesos biogeoquímicos que ocurren en el sistema suelo-agua (Song *et al.*, 2007), y por lo tanto, aumentar los riesgos de eutrofización de los cuerpos de agua cercanos (Karstens *et al.*, 2015).

Estudios previos realizados en el área de la laguna del Mar Menor han encontrado concentraciones extremadamente altas de P (de hasta $\approx 15 \text{ mg L}^{-1}$), nitrógeno (N) (de hasta $\approx 120 \text{ mg L}^{-1}$) y carbono orgánico disuelto (COD) (de hasta $\approx 100 \text{ mg L}^{-1}$), de origen agrícola y urbano, en los cursos de agua (llamados ramblas) que fluyen a través del territorio. Algunos estudios han mostrado que cuando estas aguas eutrofizadas fluyen a través de los saladares costeros, antes de llegar a la laguna, se depuran (Álvarez-Rogel *et al.*, 2006; Jiménez-Cárceles y Álvarez-Rogel, 2008), mientras que las aguas que alcanzan directamente la laguna contribuyen activamente a su eutrofización (García-Pintado *et al.*, 2007). Sin embargo, y debido a la existencia de una importante variabilidad estacional (tanto en cantidad como en calidad) de los pulsos de entrada de agua enriquecida en nutrientes, relacionada con los cambios de las actividades antrópicas a lo largo del año (González-Alcaraz *et al.*, 2012b), se hace necesario comprender mejor el comportamiento de estos humedales ante un escenario de entradas intermitentes de agua contaminada, con el fin de evaluar adecuadamente su funcionamiento y manejo. Además, el régimen de lluvias propio de la zona, que consiste en periodos de sequía con alternancia de eventos tormentosos cortos pero intensos, contribuye al fenómeno descrito anteriormente, al ocasionar eventos de crecida repentina que movilizan grandes cantidades de nutrientes al Mar Menor en momentos puntuales del año (Moreno-González *et al.*, 2013).

El objetivo específico de esta parte del trabajo fue evaluar la capacidad de retención de P en humedales afectados por aguas eutrofizadas y determinar si dicha retención está condicionada por la carga de nutrientes, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año, y determinar la contribución de los diferentes componentes del suelo, así como de las plantas de *Phragmites*, en la retención de P. Además, se proporcionan algunas recomendaciones para el manejo de estos humedales con el fin de mejorar su papel contra la eutrofización por exceso de P. Para

ello, en el experimento realizado en mesocosmos, con alternancia de condiciones de inundación–secado durante 44 semanas, se midieron regularmente las concentraciones de PO_4^{3-} en el agua de poro del suelo y en el agua de drenaje, y se analizó el P acumulado en los suelos (incluyendo un procedimiento de fraccionamiento) y las plantas (raíces, rizomas, tallos y hojas) (ver capítulo 4). En base a estudios previos de campo realizados en el área, que mostraron que el suelo desempeña un papel principal en la retención de P (Jiménez-Cárceles y Álvarez-Rogel, 2008; González-Alcaraz *et al.*, 2012b), la hipótesis inicial fue que estos saldares son muy eficaces en la eliminación del PO_4^{3-} durante todo el año, independientemente de la presencia/ausencia de *Phragmites*, pero que el papel de las plantas podría estar modulado por la carga de P en el agua eutrofizada de inundación.

7.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente capítulo recoge los resultados relacionados con la evolución de las concentraciones de P-PO_4^{3-} en el agua de poro del suelo y en el agua de drenaje; la biomasa vegetal y las concentraciones de P en las diferentes partes de *Phragmites* (raíces, rizomas, tallos y hojas) expresadas en peso seco (p. s.); la acumulación de P en el suelo, incluyendo un procedimiento de fraccionamiento (Pi–Lábil: P inorgánico soluble e intercambiable, Pi–Fe/Mn/Al: P inorgánico adsorbido a los minerales de hierro (Fe), manganeso (Mn) y aluminio (Al), Pi–Ca/Mg: P inorgánico asociado a compuestos de Ca/Mg, Po–NRS: P orgánico no reactivo soluble, y Po–Res: P orgánico residual). Para una descripción detallada de la metodología seguida ver capítulo 4.

A partir de los datos de biomasa de *Phragmites* y de la concentración de P en las diferentes partes vegetales analizadas se calcularon los contenidos totales de P almacenados por las plantas.

En cuanto al análisis estadístico de los datos, para cada horizonte de suelo (superficial y subsuperficial) y carga de nutrientes (baja y alta), la evolución de las concentraciones de P-PO_4^{3-} en el agua de poro del suelo a lo largo del tiempo se analizó mediante un ANOVA de medidas repetidas (ANOVA–RM). Los factores

incluidos en el análisis fueron: (1) factor inter-sujetos, el tratamiento, con dos niveles (sin planta + baja carga de nutrientes vs. *Phragmites* + baja carga de nutrientes, y sin planta + alta carga de nutrientes vs. *Phragmites* + alta carga de nutrientes); y (2) factor intra-sujetos, el tiempo (factor con medidas repetidas), con 39 niveles (39 muestreos; ver Tabla 4.3 del capítulo 4), aplicados a todos los tratamientos. Cuando los datos no cumplían el requerimiento de esfericidad de acuerdo al test de esfericidad de Mauchly, se optó por utilizar el estadístico F univariado aplicando el índice corrector epsilon en base a las estimaciones de Greenhouse-Geisser, Huynh-Feldt y límite inferior (SPSS Inc, 2006). Un efecto significativo del tiempo indica que las concentraciones de $P-PO_4^{3-}$ evolucionaron significativamente a lo largo del experimento, independientemente del tratamiento. Un efecto significativo de la interacción tiempo x tratamiento indica que la evolución de las concentraciones de $P-PO_4^{3-}$ difirió entre tratamientos. Un efecto significativo del tratamiento indica que las concentraciones medias de $P-PO_4^{3-}$ fueron diferentes entre los tratamientos ensayados.

Para cada parte de la planta (raíces, rizomas, tallos y hojas), las diferencias en cuanto a biomasa seca total, concentraciones de P y contenido total de P almacenado por las plantas de *Phragmites* entre los tratamientos de baja y alta carga de nutrientes se compararon mediante el test de la t de Student.

Para los horizontes superficiales del suelo, las concentraciones iniciales de P en el suelo (P-Total y P de cada fracción analizada) se compararon entre los cuatro tratamientos ensayados mediante un ANOVA de una vía, seguido de la prueba post-hoc del test de Bonferroni, para detectar si había diferencias justo antes de comenzar con los ciclos de inundación-secado. Los horizontes subsuperficiales del suelo no se compararon antes de comenzar con los ciclos de inundación-secado ya que no se pudieron extraer muestras de arena sin perturbar fuertemente los mesocosmos. Suponemos que los horizontes subsuperficiales arenosos tenían concentraciones iniciales de P similares, dado que la arena fue tomada del mismo lugar en el sistema dunar. Para cada horizonte del suelo y tratamiento, las concentraciones iniciales vs.

finales de P en el suelo (P–Total y P de cada fracción analizada) se compararon mediante el test de la t de Student.

Las relaciones entre las concentraciones de P en *Phragmites* y en las fracciones del suelo se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. CONCENTRACIONES DE P–PO₄³⁻ EN EL AGUA DE PORO DEL SUELO Y EN LOS DRENAJES

Las concentraciones de P–PO₄³⁻ en el agua de poro fueron siempre mayores en los horizontes superficiales del suelo en todos los tratamientos ensayados (Figura 7.1). En dichos horizontes las concentraciones de P–PO₄³⁻ disminuyeron fuertemente en cada ciclo de inundación–secado durante el primer día de inundación de los mesocosmos (de ≈1,95 mg L⁻¹ en el agua de inundación a ≈0,10–0,30 mg L⁻¹ en el agua de poro en los tratamientos con agua de baja carga de nutrientes, y de ≈19,5 mg L⁻¹ en el agua de inundación a ≈0,4–0,8 mg L⁻¹ en el agua de poro en los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes; Figura 7.1), una reducción > 90 % con respecto a las concentraciones en el agua de inundación (Tabla 7.1). En los horizontes subsuperficiales del suelo, las concentraciones de P–PO₄³⁻ durante el primer día de inundación de los mesocosmos fueron < 0,1 mg L⁻¹ en todos los tratamientos ensayados, excepto en el tratamiento *Phragmites* + alta carga de nutrientes que mostró concentraciones ≈0,1–0,3 mg L⁻¹ (Figura 7.1d). A lo largo del experimento, las concentraciones de P–PO₄³⁻ en el agua de poro del suelo se redujeron significativamente en cada ciclo de inundación–secado (efecto del tiempo, p ≤ 0,034), alcanzando concentraciones < 0,1 mg L⁻¹ al final de las fases de secado, independientemente del horizonte del suelo y de la carga de nutrientes del agua de inundación (Figura 7.1). La interacción tiempo x tratamiento y el tratamiento no fueron significativos ni en los horizontes superficiales ni en los subsuperficiales del suelo. Esto indicó que, a ambas profundidades y para ambas cargas de nutrientes del agua de inundación, las variaciones temporales y las concentraciones medias de P–PO₄³⁻ en el

agua de poro del suelo fueron similares, respectivamente, independientemente de la presencia de *Phragmites*.

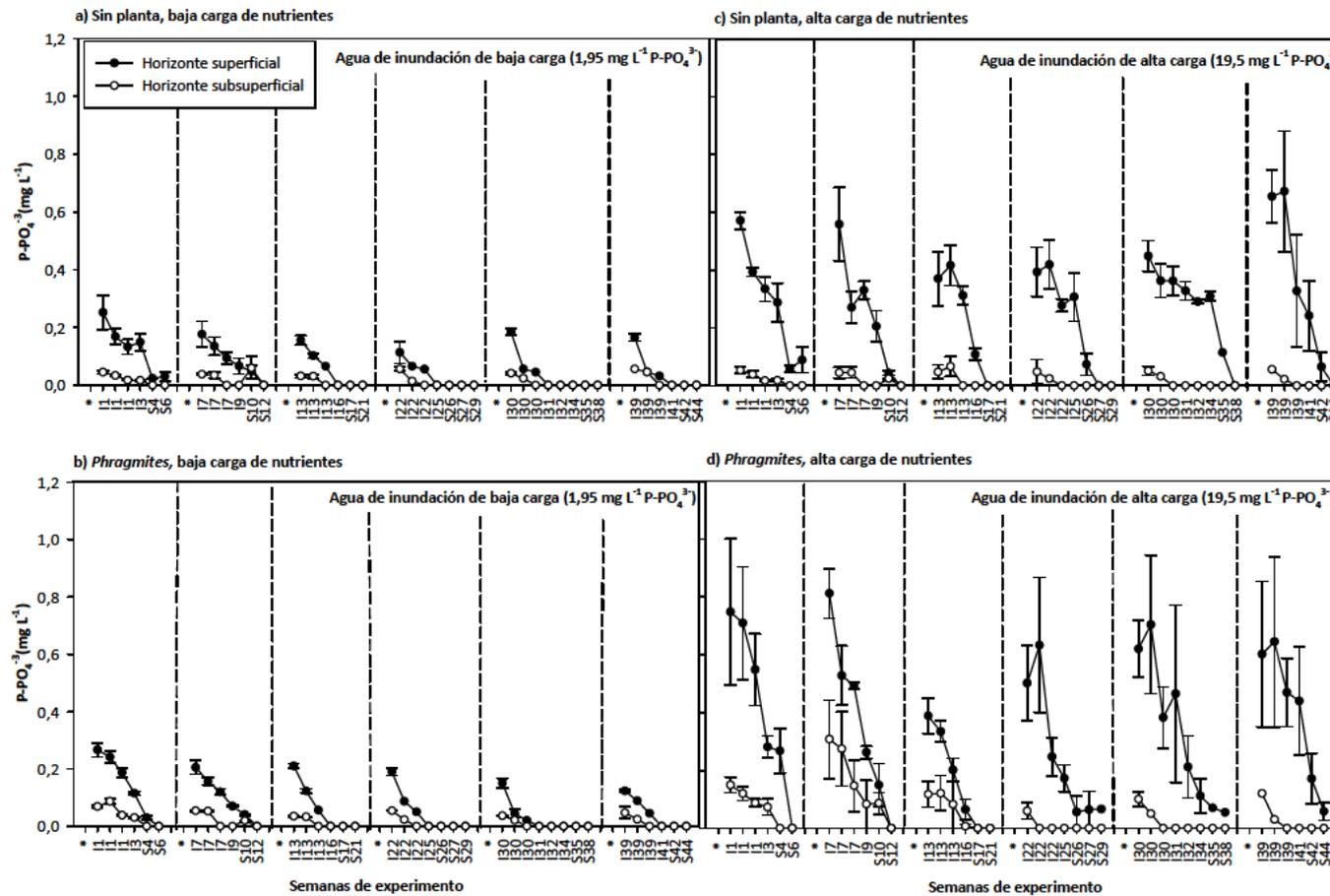


Figura 7.1. Evolución de las concentraciones de $P-PO_4^{3-}$ en el agua de poro del suelo durante el experimento en todos los tratamientos ensayados. Los valores son la media \pm error estándar ($n = 3$). En el eje de abscisas, con una I se hace referencia a las fases de inundación y con una S a las de secado, y los números indican la semana del experimento (por ejemplo, I22 fue la semana 22 del experimento que perteneció a la cuarta fase de inundación; S35 fue la semana 35 del experimento que perteneció a la quinta fase de secado). Durante la primera semana de cada fase de inundación se tomaron muestras durante tres días alternos. Con un asterisco (*) se designa a la adición de agua eutrofizada al inicio de cada fase de inundación. Baja carga de nutrientes: $1,95 \text{ mg L}^{-1} P-PO_4^{3-}$. Alta carga de nutrientes: $19,5 \text{ mg L}^{-1} P-PO_4^{3-}$.

Las concentraciones de $P-PO_4^{3-}$ en el agua de drenaje recogida después de cada fase de inundación fueron $< 0,5 \text{ mg L}^{-1}$, lo que supuso un porcentaje de reducción $> 97 \%$ con respecto a las concentraciones en el agua de inundación (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Eficiencia de los mesocosmos experimentales para reducir las concentraciones de $P-PO_4^{3-}$ del agua eutrofizada de inundación. Los valores son la media de las seis fases de inundación \pm desviación estándar (para cada fase de inundación, $n = 3$). BC: baja carga de nutrientes, $1,95 \text{ mg L}^{-1} P-PO_4^{3-}$. AC: alta carga de nutrientes, $19,5 \text{ mg L}^{-1} P-PO_4^{3-}$.

Tratamiento	% de reducción de $P-PO_4^{3-}$ en el agua de poro de los horizontes superficiales del suelo en relación al agua de inundación 24 h después de inundar	Agua de inundación vs. Agua de drenaje
		A) $P-PO_4^{3-}$ en el agua de drenaje (mg L^{-1}) B) % de reducción (entrada vs. salida)
Sin planta, BC	$93 \pm 1,4$	A) $0,06 \pm 0,011$ B) $97 \pm 0,67$
<i>Phragmites</i> , BC	$94 \pm 1,9$	A) $0,04 \pm 0,006$ B) $97 \pm 0,26$
Sin planta, AC	$97 \pm 0,2$	A) $0,29 \pm 0,095$ B) $99 \pm 0,41$
<i>Phragmites</i> , AC	$97 \pm 0,4$	A) $0,10 \pm 0,028$ B) $99 \pm 0,10$

7.3.2. BIOMASA DE *Phragmites australis* Y ACUMULACIÓN DE FÓSFORO (P) EN LAS PLANTAS

Las plantas de *Phragmites* inundadas con agua de alta carga de nutrientes mostraron una biomasa de raíces significativamente menor ($\approx 64 \text{ g p. s.}$ con agua de baja carga de nutrientes vs. $\approx 34 \text{ g p. s.}$ con agua de alta carga de nutrientes, $p = 0,003$) y una biomasa de rizomas significativamente mayor ($\approx 352 \text{ g p. s.}$ con agua de baja carga de nutrientes vs. $\approx 462 \text{ g p. s.}$ con agua de alta carga de nutrientes, $p = 0,036$) que las plantas inundadas con agua de baja carga de nutrientes (Figura 7.2a). No hubo diferencias significativas en la biomasa total de tallos ($\approx 186\text{--}386 \text{ g p. s.}$) y hojas ($\approx 73\text{--}165 \text{ g p. s.}$) entre las plantas inundadas con agua de baja y alta carga de nutrientes (Figura 7.2a).

Los rizomas fueron los órganos que mostraron las mayores concentraciones de P ($> 1200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$), independientemente de la carga de nutrientes del agua de inundación (Figura 7.2b). El uso de agua de alta carga de nutrientes dio lugar a concentraciones de P significativamente mayores ($p \leq 0,014$) en las raíces ($\approx 612 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$ con agua de baja carga de nutrientes vs. $\approx 985 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$ con agua de alta carga de nutrientes), rizomas ($\approx 1244 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$ con agua de baja carga de nutrientes vs. $\approx 1481 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$ con agua de alta carga de nutrientes) y tallos ($\approx 442 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$ con agua de baja carga de nutrientes vs. $\approx 886 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$ con agua de alta carga de nutrientes), en comparación con los tratamientos de baja carga de nutrientes, pero no en las hojas ($\approx 458\text{--}738 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$) (Figura 7.2b).

El contenido total de P almacenado por las plantas de *Phragmites* (Figura 7.2c) mostró que los rizomas y tallos de las plantas inundadas con agua de alta carga de nutrientes acumularon cantidades de P significativamente ($p = 0,017$) mayores que las plantas inundadas con agua de baja carga de nutrientes: $\approx 907 \text{ mg m}^{-2} \text{ p. s.}$ con agua de baja carga de nutrientes vs. $\approx 1369 \text{ mg m}^{-2} \text{ p. s.}$ con agua de alta carga de nutrientes (rizomas), y $\approx 238 \text{ mg m}^{-2} \text{ p. s.}$ con agua de baja carga de nutrientes vs. $\approx 366 \text{ mg m}^{-2} \text{ p. s.}$ con agua de alta carga de nutrientes (tallos). No hubo diferencias significativas para las raíces ($\approx 56\text{--}82 \text{ mg m}^{-2} \text{ p. s.}$) y las hojas ($\approx 71\text{--}177 \text{ mg m}^{-2} \text{ p. s.}$) (Figura 7.2c).

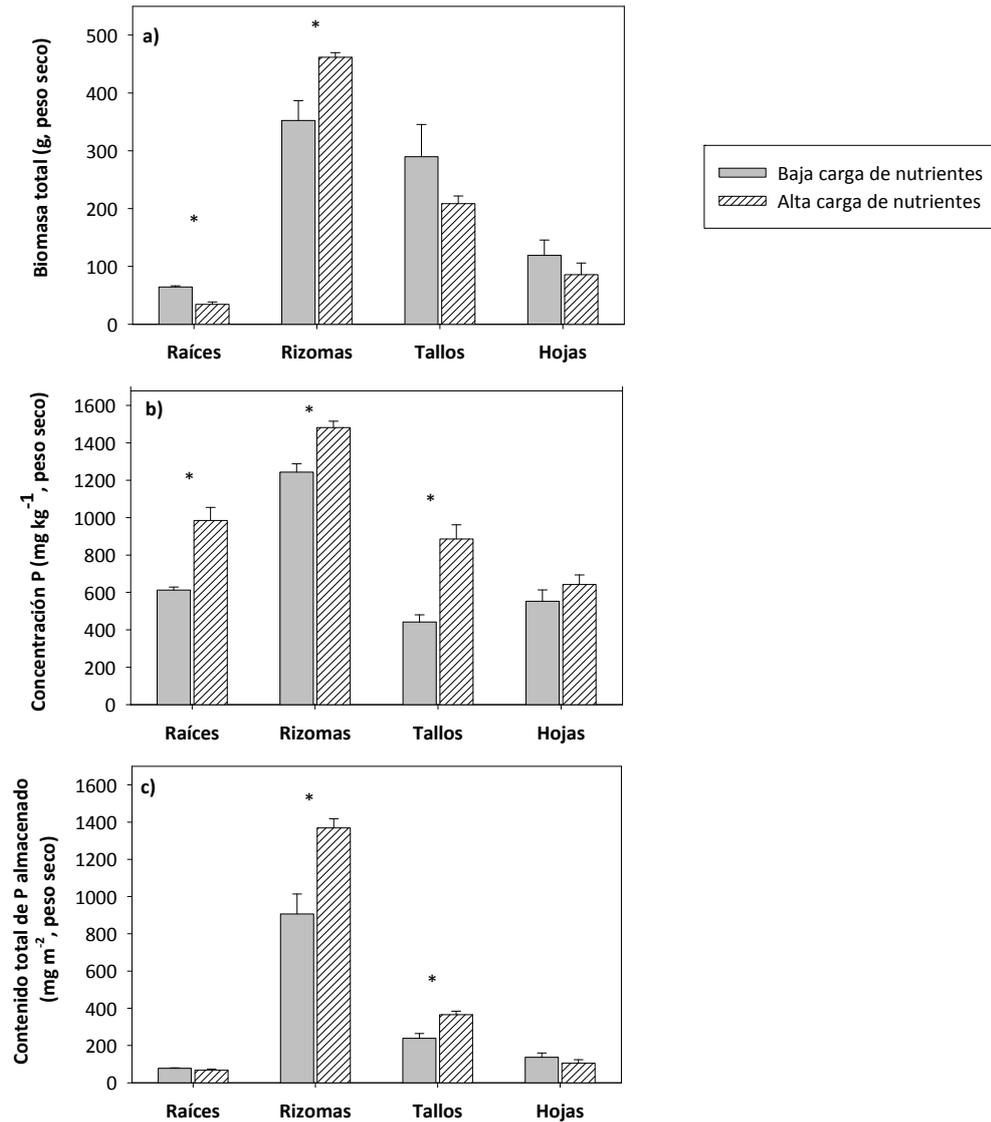


Figura 7.2. Biomasa total (a), concentración de fósforo (P) (b), y contenido total de P almacenado por las plantas (c) en las raíces, rizomas, tallos y hojas de *Phragmites australis* al final de las 44 semanas experimentales. Los valores son la media y las barras sobre las columnas el error estándar (n = 3). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos para cada parte de las plantas (test de la t de Student, p < 0,05). Baja carga de nutrientes: 1,95 mg L⁻¹ P-PO₄³⁻. Alta carga de nutrientes: 19,5 mg L⁻¹ P-PO₄³⁻.

7.3.3. CONCENTRACIONES DE FÓSFORO (P) EN LOS SUELOS

Los porcentajes de las diferentes fracciones de P analizadas (Figura 7.3) mostraron que en los horizontes superficiales del suelo el P se encontró tanto en forma inorgánica (34–53 % Pi-Ca/Mg) como orgánica (Po-Res 38–54 %), mientras que en los horizontes subsuperficiales apareció mayoritariamente como P orgánico (83–92 % Po-Res).

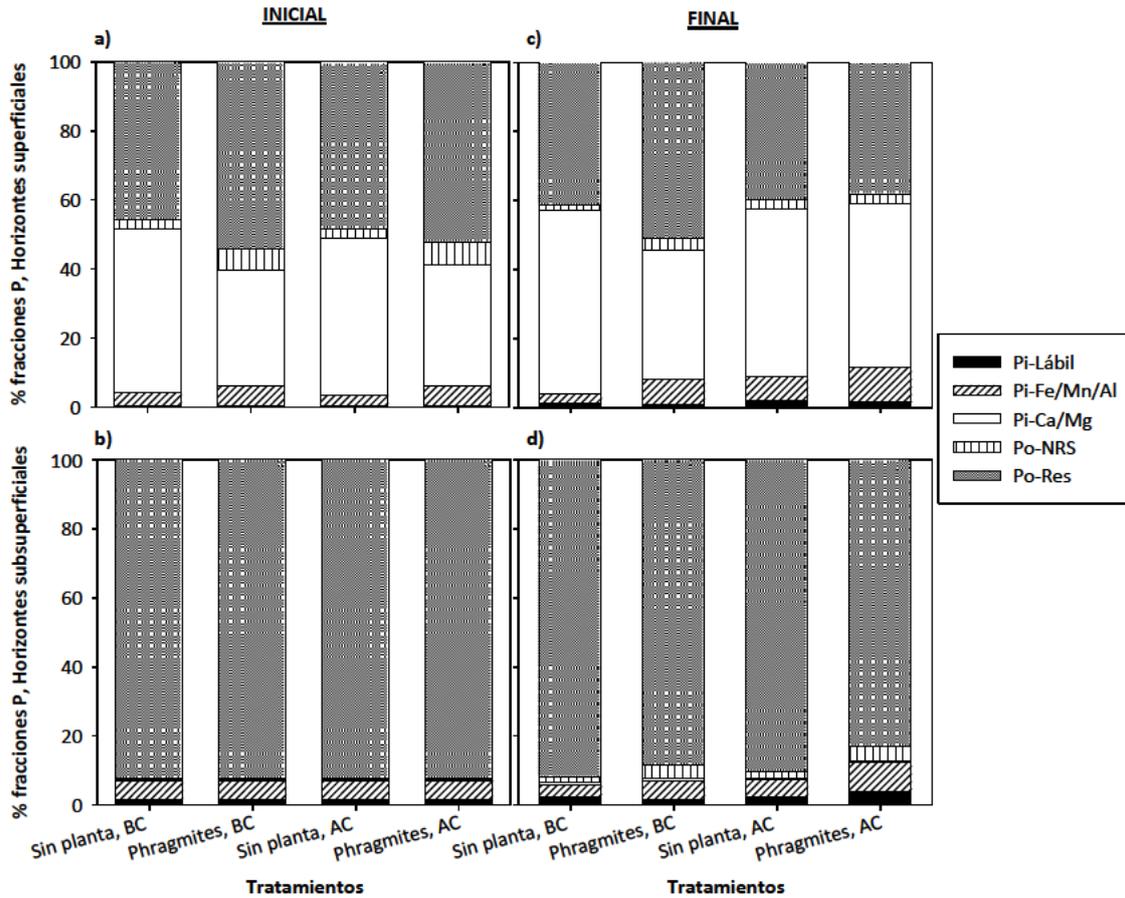


Figura 7.3. Porcentaje de las diferentes fracciones de fósforo (P) analizadas antes (inicial) y después (final) de las 44 semanas experimentales en los horizontes superficiales (a, c) y subsuperficiales (b, d) del suelo. Los valores son la media ($n = 3$). Pi: fósforo inorgánico. Po: fósforo orgánico. Pi-Lábil: fósforo inorgánico soluble e intercambiable. Pi-Fe/Mn/Al: fósforo inorgánico adsorbido a los minerales de Fe, Mn y Al. Pi-Ca/Mg: fósforo inorgánico asociado a compuestos de Ca/Mg. Po-NRS: fósforo orgánico no reactivo soluble. Po-Res: fósforo orgánico residual. BC: baja carga de nutrientes, $1,95 \text{ mg L}^{-1} \text{ P-PO}_4^{3-}$. AC: alta carga de nutrientes, $19,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ P-PO}_4^{3-}$.

En los horizontes superficiales del suelo, todos los tratamientos ensayados mostraron concentraciones iniciales de P-Total similares ($\approx 467\text{--}497 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$, Figura 7.4a), así como de Pi-Lábil ($\approx 1,14\text{--}1,42 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$, Figura 7.5a), Pi-Fe/Mn/Al ($\approx 15,2\text{--}28,9 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$, Figura 7.5b) y Po-Res ($\approx 214\text{--}260 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$, Figura 7.5e). Sin embargo, los tratamientos sin plantas mostraron concentraciones iniciales de Pi-Ca/Mg significativamente mayores ($\approx 216\text{--}222 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$ sin plantas vs. $\approx 158\text{--}175 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$ con *Phragmites*, $p \leq 0,003$, Figura 7.5c), mientras que aquellos con plantas de *Phragmites* presentaron concentraciones de Po-Res significativamente mayores ($\approx 12,2\text{--}13,8 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$ sin plantas vs. $\approx 27,8\text{--}32,8 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p. s.}$ con *Phragmites*, $p = 0,001$, Figura 7.5d).

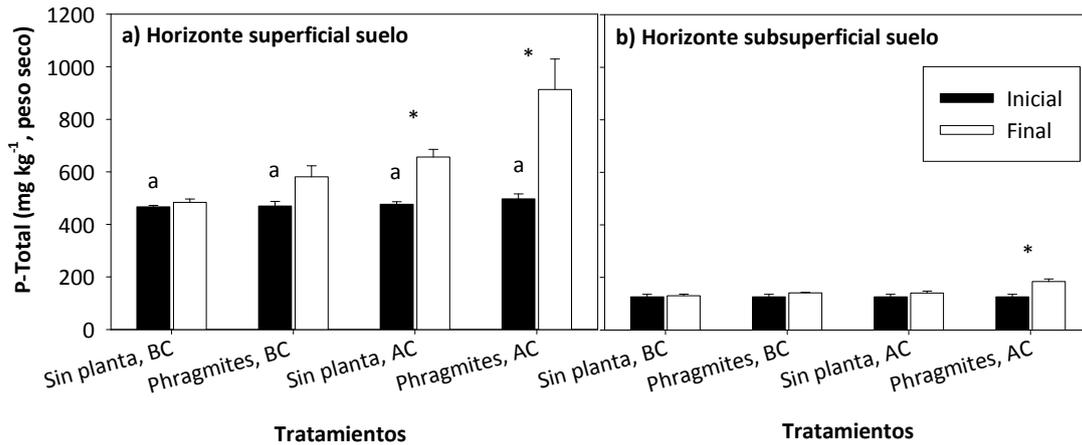


Figura 7.4. Concentraciones totales de fósforo (P–Total) antes (inicial) y después (final) de las 44 semanas experimentales en los horizontes superficiales (a) y subsuperficiales (b) del suelo. Los valores son la media y las barras sobre las columnas el error estándar ($n = 3$). *Diferentes letras* indican diferencias significativas para las concentraciones iniciales entre los tratamientos ensayados (ANOVA de una vía seguido del test post–hoc de Bonferroni, $p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las concentraciones iniciales y finales para un tratamiento dado (test de la t de Student, $p < 0,05$). BC: baja carga de nutrientes; $1,95 \text{ mg L}^{-1} \text{ P-PO}_4^{3-}$. AC: alta carga de nutrientes; $19,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ P-PO}_4^{3-}$.

Tras las 44 semanas experimentales, las concentraciones de P–Total aumentaron significativamente ($p \leq 0,024$) en los horizontes superficiales del suelo en los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes (de ≈ 477 a $\approx 656 \text{ mg kg}^{-1}$ p. s. sin plantas y de ≈ 497 a $\approx 913 \text{ mg kg}^{-1}$ p. s. con *Phragmites*), pero no en los tratamientos con agua de baja carga de nutrientes (de ≈ 470 a $\approx 484 \text{ mg kg}^{-1}$ p. s. sin plantas y de ≈ 470 a $\approx 581 \text{ mg kg}^{-1}$ p. s. con *Phragmites*) (Figura 7.4a). El fraccionamiento del P mostró que al final del experimento las concentraciones de P aumentaron significativamente en la fracción de Pi–Lábil en todos los tratamientos ensayados (de $\approx 1,14$ – $1,42$ a $\approx 4,35$ – $14,1 \text{ mg kg}^{-1}$ p. s., $p \leq 0,027$, Figura 7.5a), en la fracción de Pi–Fe/Mn/Al en los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes (de $\approx 15,2$ – $28,9$ a $\approx 42,3$ – $87,6 \text{ mg kg}^{-1}$ p. s., $p \leq 0,028$, Figura 7.5b), y en la fracción Pi–Ca/Mg en todos los tratamientos ensayados (de ≈ 158 – 216 a ≈ 215 – 413 mg kg^{-1} p. s., $p \leq 0,039$), excepto en el tratamiento sin planta + baja carga de nutrientes (Figura 7.5c). Sin embargo, las fracciones de Po–NRS ($\approx 7,17$ – $32,8 \text{ mg kg}^{-1}$ p. s., Figura 7.5d) y Po–Res (≈ 201 – 348 mg kg^{-1} p. s., Figura 7.5e) fueron similares antes y después del experimento.

En los horizontes subsuperficiales del suelo, tras las 44 semanas experimentales, las concentraciones de P–Total aumentaron significativamente ($p = 0,013$) en el

tratamiento *Phragmites* + alta carga de nutrientes (de ≈ 127 a ≈ 185 mg kg⁻¹ p. s., Figura 7.4b). En cuanto al fraccionamiento: las concentraciones de P aumentaron significativamente en la fracción de Pi-Lábil en todos los tratamientos ensayados (de $\approx 1,99$ a $\approx 2,87-6,96$ mg kg⁻¹ p. s., $p \leq 0,018$, Figura 7.5f), excepto en el tratamiento *Phragmites* + baja carga de nutrientes; la fracción de Pi-Fe/Mn/Al aumentó significativamente en el tratamiento *Phragmites* + alta carga de nutrientes (de $\approx 6,84$ a $\approx 15,9$ mg kg⁻¹ p. s., $p = 0,010$, Figura 7.5g); la fracción de Po-NRS aumentó significativamente en todos los tratamientos ensayados (de $\approx 2,01$ a $\approx 7,96$ mg kg⁻¹ p. s., $p \leq 0,045$, Figura 7.5i); las fracciones de Pi-Ca/Mg ($\approx 0,45$ a $1,21$ mg kg⁻¹ p. s., Figura 7.5h) y Po-Res ($\approx 117-153$ mg kg⁻¹ p. s., Figura 7.5j) fueron similares antes y después del experimento.

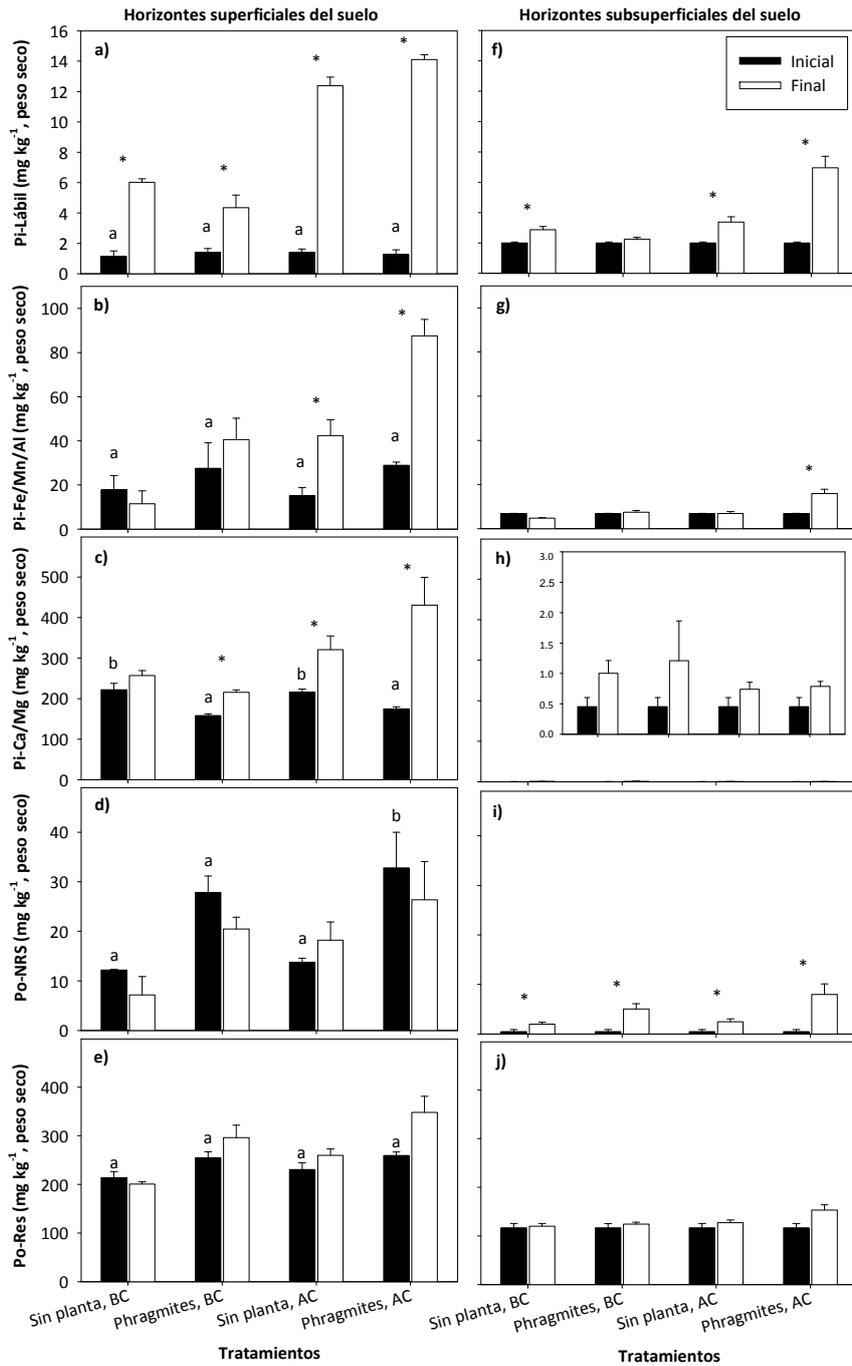


Figura 7.5. Concentraciones de fósforo (P) antes (inicial) y después (final) de las 44 semanas experimentales para las diferentes fracciones analizadas en los horizontes superficiales (a, b, c, d, e) y subsuperficiales (f, g, h, i, j) del suelo. Los valores son la media y las barras sobre las columnas el error estándar (n = 3). *Diferentes letras* indican diferencias significativas para las concentraciones iniciales entre los tratamientos ensayados (ANOVA de una vía seguido del test post-hoc de Bonferroni, p < 0,05). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las concentraciones iniciales y finales para un tratamiento dado (test de la t de Student, p < 0,05). Pi: fósforo inorgánico. Po: fósforo orgánico. Pi-Lábil: fósforo inorgánico soluble e intercambiable. Pi-Fe/Mn/Al: fósforo inorgánico adsorbido a los minerales de Fe, Mn y Al. Pi-Ca/Mg: fósforo inorgánico asociado a compuestos de Ca/Mg. Po-NRS: fósforo orgánico no reactivo soluble. Po-Res: fósforo orgánico residual. BC: baja carga de nutrientes; 1,95 mg L⁻¹ P-PO₄³⁻. AC: alta carga de nutrientes; 19,5 mg L⁻¹ P-PO₄³⁻.

7.4. DISCUSIÓN

7.4.1. ELIMINACIÓN DEL FÓSFORO (P) DEL AGUA EUTROFIZADA DE INUNDACIÓN

En la literatura científica se recogen datos que indican un amplio rango en cuanto a la capacidad de los humedales artificiales para retirar P ($\approx 20\text{--}93\%$; Moore y Kröger, 2011 y referencias allí citadas). El buen funcionamiento de los mesocosmos experimentales ensayados en esta Tesis ($> 90\%$, Tabla 7.1), independientemente de la presencia de *Phragmites*, sugiere que el suelo fue el principal sumidero del P añadido al sistema. Este resultado concuerda con estudios previos que no mostraron diferencias en la eliminación de P entre humedales con y sin vegetación (por ejemplo, Nairn y Mitsch, 2000; Yang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2011; Moustafa *et al.*, 2011). Además, la menor actividad fisiológica de las plantas de *Phragmites* a partir de la semana S27 en adelante (ver capítulo 5) no afectó a la capacidad de los mesocosmos de retirar el P del agua de inundación. Dado que el estado fisiológico de las plantas afecta a su capacidad de acumulación de nutrientes (Reddy y DeLaune, 2008), este último hallazgo apoya el papel principal del suelo en la retención del P. De hecho, la dinámica del P-PO_4^{3-} en el agua de poro del suelo a lo largo del experimento fue similar en todos los tratamientos ensayados, independientemente de la presencia de *Phragmites* y de la carga de nutrientes del agua de inundación (Figura 7.1). Las concentraciones de P-PO_4^{3-} en el agua de poro siguieron una cinética de adsorción típica del P soluble en sedimentos, con una rápida adsorción inicial (fuerte caída de las concentraciones de P-PO_4^{3-} en el agua de poro del suelo en relación al agua de inundación tras 24 h de inundación), donde se retuvo la mayor parte del P-PO_4^{3-} , y una posterior adsorción más lenta (desde el primer día de inundación en adelante) (Reddy y DeLaune, 2008; Wang *et al.*, 2009; Azzouz *et al.*, 2012; González-Alcaraz *et al.*, 2012a). Ni la estación del año y la presencia de vegetación, ni la alternancia de ciclos de inundación–secado, pareció afectar este comportamiento (Figura 7.1). Dado que el agua se introdujo en los mesocosmos simulando una inundación superficial, las concentraciones de P-PO_4^{3-} del agua de poro siempre fueron mayores en los horizontes superficiales del suelo que en los subsuperficiales (Figura 7.1). Esta distribución vertical del P inorgánico disuelto concuerda con estudios de campo que

reportaron concentraciones de P más altas en los horizontes superficiales de suelos de humedales inundados (por ejemplo, Gao *et al.*, 2015). Además, la mayor reactividad de los horizontes superficiales del suelo de textura fina, en comparación con el material subsuperficial arenoso, favoreció que la mayor parte del P añadido con el agua de inundación fuese retenido en los horizontes superficiales, recibiendo los horizontes subsuperficiales concentraciones más bajas de $P-PO_4^{3-}$ (Figura 7.1).

Algunos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la vegetación de los humedales en la retirada del P. Por ejemplo, Silvan *et al.* (2004) indicaron una capacidad de retención por parte de la biomasa vegetal del 25 % del P añadido en humedales artificiales, y Fink y Mitsch (2007) destacaron el papel de las plantas en la eliminación del P en un humedal emergente. Zhao *et al.* (2010 y referencias allí citadas) encontraron un mejor funcionamiento en relación a la retirada del P de humedales artificiales con plantas que sin vegetación, pero indicaron que el papel de las plantas estuvo influido por factores tales como las tasas de carga de nutrientes y la estación del año. En nuestro experimento, tras las 44 semanas experimentales, la biomasa de *Phragmites* acumuló un total de $\approx 1360 \text{ mg m}^{-2}$ p. s. de P en el tratamiento con agua de baja carga de nutrientes y $\approx 1907 \text{ mg m}^{-2}$ p. s. de P en el tratamiento con agua de alta carga de nutrientes (Figura 7.2c), representando respectivamente $\approx 27 \%$ y $\approx 12 \%$ del P total añadido con el agua de inundación. Por tanto, es evidente que las plantas tuvieron alguna influencia en las concentraciones de P en el sistema suelo-agua de los mesocosmos experimentales, pero su papel en la retirada del P fue menor en comparación con el del suelo. Lo más probable, y como se comenta más adelante (ver apartado 7.4.3), la presencia de *Phragmites* tuvo un papel más relevante en la movilización del P entre las fases sólida y soluble del sistema.

7.4.2. BIOMASA DE *Phragmites australis* Y DISTRIBUCIÓN DEL FÓSFORO (P) EN LAS PLANTAS

No se encontraron diferencias significativas en la biomasa aérea de las plantas de *Phragmites* entre ambas cargas de nutrientes en el agua de inundación, aunque las plantas inundadas con agua de alta carga de nutrientes tendieron a mostrar una

menor biomasa de tallos y hojas (Figura 7.2a). Esto, junto con una biomasa de rizomas significativamente mayor de las plantas inundadas con agua de alta carga de nutrientes, pudo estar relacionado con unas condiciones más estresantes a mayor carga de nutrientes, tal y como se pone de manifiesto por una peor capacidad fotosintética de las plantas de *Phragmites* en este tratamiento (ver capítulo 5). Los rizomas fueron los órganos con mayor biomasa, independientemente de la carga de nutrientes del agua de inundación (Figura 7.2a). Probablemente, las plantas de *Phragmites* produjeron una mayor biomasa de rizomas para aumentar la difusión de gases en el suelo, y así poder enfrentarse a las condiciones extremas de anoxia alcanzadas a lo largo del experimento (ver capítulo 5).

Se encontraron concentraciones de P más altas en las plantas inundadas con agua de alta carga de nutrientes (con diferencias significativas en raíces, rizomas y tallos; Figura 7.2b), lo que llevó a un contenido total de P acumulado significativamente mayor en la biomasa de rizomas y tallos (Figura 7.2c). Las concentraciones de P en las diferentes partes de las plantas estuvieron en los rangos observados por González-Alcaraz *et al.* (2012b) en plantas de *Phragmites* creciendo en el saladar de la Marina del Carmolí. A diferencia de nuestro experimento, estos autores no encontraron diferencias en las concentraciones de P en los tejidos de plantas de *Phragmites* creciendo en dos suelos con diferente contenido en P (González-Alcaraz *et al.*, 2012). En el mismo estudio, estos autores encontraron variaciones estacionales importantes en las concentraciones de P en las diferentes partes de *Phragmites*, relacionando este comportamiento con la translocación de nutrientes entre órganos. Es ampliamente conocido que durante el invierno esta especie transloca nutrientes desde las partes aéreas a los rizomas, retranslocándolos de nuevo a los tallos y hojas en la siguiente estación de crecimiento (Boar, 1996; Tylová *et al.*, 2008). En nuestro experimento, la temperatura media del aire se redujo de $\approx 25\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $\approx 10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a partir de la semana S29 en adelante (ver capítulo 5), y esto pudo inducir un mayor transporte de nutrientes a los rizomas, explicando así los resultados obtenidos cuando las plantas fueron recolectadas al final del experimento.

7.4.3. FRACCIONAMIENTO DEL FÓSFORO (P) EN LOS SUELOS

El uso de procedimientos de fraccionamiento permite identificar qué componentes edáficos son los principales responsables de la retención del P por el suelo. Los datos iniciales indicaron que en el suelo recogido de la zona con plantas de *Phragmites* el P inorgánico representaba $\approx 40\%$ del P total, mientras que el P orgánico $\approx 60\%$ (Figura 7.3a). En el suelo sin plantas, $\approx 50\%$ del P total fue inorgánico y $\approx 50\%$ orgánico (Figura 7.3a). Nuestros resultados estuvieron dentro del rango de P inorgánico indicado por Reddy y DeLaune (2008) para suelos minerales de humedales (20–50 %). Las diferencias entre ambos suelos podrían ser atribuibles al mayor contenido en materia orgánica del suelo de la zona de *Phragmites* (Tabla 4.1, ver Capítulo 4). En ambos tipos de suelos, la fracción mayoritaria de P inorgánico fue el Pi–Ca/Mg (34–48 %, Figura 7.3a), en concordancia con los datos de campo obtenidos por Jiménez-Cárceles y Álvarez-Rogel (2008) y González-Alcaraz *et al.* (2012b) en el saladar de la Marina del Carmolí. Otros estudios han señalado también a los compuestos de Ca/Mg como componentes clave del suelo que contribuyen a retener P en ambientes calcáreos (por ejemplo, Poach y Faulkner, 1998; Xu *et al.*, 2014). Por el contrario, en las muestras de arena, la mayor parte del P fue orgánico, con más del 90 % en forma de Po–Res (Figura 7.3b). Dado que el material arenoso tenía un mayor contenido en carbonato cálcico (CaCO_3) total y un menor contenido en materia orgánica (determinada como pérdida por ignición, LOI) que las muestras superficiales de suelo (Tabla 4.1, ver capítulo 4), las diferencias en las principales formas del P deberían ser atribuibles al tipo de CaCO_3 y de compuestos orgánicos presentes, no a las cantidades totales. Los horizontes superficiales de textura fina de los suelos del saladar son ricos en carbonatos secundarios (Álvarez-Rogel *et al.*, 2001), con alto contenido en caliza activa, una fracción de carbonato altamente reactiva (Legros, 2012). Sin embargo, la arena está constituida por granos oolíticos formados por carbonatos primarios de origen marino, con baja reactividad química, como ya se ha observado en otros estudios (Shao *et al.*, 2014). Además, la mayor parte de la escasa materia orgánica presente en la arena incluye pequeños trozos leñosos no mineralizados de restos de raíces, y por lo tanto era de esperar que el P en estas muestras fuese extraído como Po–Res.

Tras las 44 semanas experimentales, las concentraciones de P–Total aumentaron, especialmente en los horizontes superficiales del suelo (Figura 7.4), en concordancia con la explicación anterior sobre las concentraciones de $P-PO_4^{3-}$ más altas en el agua de poro de dichos horizontes. Este aumento sólo fue significativo en los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes, independientemente de la presencia de plantas, a pesar de que los tratamientos con *Phragmites* recibieron un mayor aporte de agua (a fin de reponer el agua absorbida por las plantas), y por tanto de P, a lo largo del experimento. Por consiguiente, la carga de nutrientes del agua de inundación fue un factor clave determinando los aumentos de las concentraciones de P en el suelo.

La fracción de Pi–Lábil había aumentado significativamente al final del experimento en casi todos los tratamientos ensayados y en ambos horizontes del suelo (Figuras 7.5a y 7.5f). Aunque esta fracción representaba menos del 3,5 % del P total del suelo (Figura 7.3), incluye las formas de P más fácilmente asimilables y, por lo tanto, fue un factor clave en la acumulación de P por *Phragmites*, tal y como se muestra por la correlación positiva significativa entre el Pi–Lábil y las concentraciones de P en raíces, rizomas y tallos ($r > 0,744$, $p = 0,001$). Es más, las plantas pueden influir en las concentraciones de Pi–Lábil no sólo por absorción, sino también induciendo cambios microbiológicos y biogeoquímicos en la rizosfera que pueden contribuir a movilizar o inmovilizar el P del agua de poro (Hinsinger *et al.*, 2009; González-Alcaraz *et al.*, 2012a).

En los horizontes superficiales del suelo, tras las 44 semanas experimentales, las concentraciones de Pi–Fe/Mn/Al habían aumentado significativamente en los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes (Figura 7.5b) y las de Pi–Ca/Mg en todos los tratamientos ensayados, excepto en el tratamiento sin planta + baja carga de nutrientes (Figura 7.5c). El P adherido a compuestos de Ca y Mg se considera una fracción estable, no disponible para asimilación biológica (Reddy *et al.*, 1995). El Pi–Fe/Mn/Al es una fracción sensible a procesos redox que bajo condiciones anaeróbicas puede liberar el P adsorbido al agua de poro si Fe y Mn son solubilizados (Reddy *et al.*, 1995; Dupas, 2015). Dado que esta fracción no disminuyó en los mesocosmos experimentales, esta liberación no pareció ocurrir, a pesar de los bajos valores del Eh

alcanzados durante algunas semanas de las fases de inundación ($Eh < 0$ mV; capítulo 5), o si ocurrió no fue detectada, probablemente debido al suministro recurrente de P al inundar los mesocosmos. La presencia de *Phragmites* contribuyó principalmente a incrementar el % de P retenido en la fracción de Pi-Fe/Mn/Al en los tratamientos con agua de alta carga de nutrientes (de ≈ 35 a ≈ 47 %, Figura 7.3). Esto pudo atribuirse a la presencia del aerénquima en *Phragmites* (Armstrong *et al.*, 2000), que promueve los flujos de oxígeno (O_2) y dióxido de carbono (CO_2) a través de los rizomas, favoreciendo un entorno más oxidante en la rizosfera y facilitando así la acumulación de P en los óxidos metálicos. Huang *et al.* (2015) también encontraron mayores concentraciones de P adsorbido a compuestos de Fe/Al en suelos con *Phragmites* que en suelo sin plantas.

En los horizontes subsuperficiales arenosos, tras las 44 semanas experimentales, el P adsorbido a los óxidos metálicos había aumentado significativamente en el tratamiento *Phragmites* + alta carga de nutrientes (Figura 7.5g), probablemente debido al efecto oxidante de los rizomas (ver capítulo 5). En todos los tratamientos ensayados, la fracción de Po-NRS se había incrementado significativamente al final del experimento, independientemente de la carga de nutrientes del agua de inundación y de la presencia de *Phragmites* (Figura 7.5i). Esto pudo estar relacionado con la transferencia de este tipo de P orgánico desde los horizontes superficiales del suelo, más enriquecidos en Po-NRS que la arena (Figuras 7.5d y 7.5.i), debido al flujo vertical de agua cuando los grifos de drenaje se abrían al final de las fases de inundación. De hecho, e incluso si todos los tratamientos mostraron un incremento de la fracción de Po-NRS, los tratamientos con *Phragmites* alcanzaron mayores concentraciones, probablemente debido a las concentraciones de Po-NRS significativamente más altas en el suelo de la zona de *Phragmites* (Figura 7.5d), en relación con el mayor contenido en materia orgánica de este tipo de suelo (Tabla 4.1, ver capítulo 4).

7.5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE MANEJO

El presente estudio mostró que: 1) los mesocosmos experimentales fueron altamente eficaces en la retirada del P independientemente de la carga de nutrientes

del agua de inundación, el periodo del año y la presencia/ausencia de *Phragmites* (reducción > 90 % del P añadido al sistema tanto en el agua de poro del suelo como en el agua de drenaje); 2) la mayor parte del P añadido al sistema fue retenido en el suelo, principalmente en compuestos de Ca/Mg en el horizonte superficial, mientras que las plantas de *Phragmites* tuvieron un papel minoritario; 3) *Phragmites* favoreció la retención de P en los óxidos metálicos; 4) los rizomas de *Phragmites* fueron los órganos que más contribuyeron a la acumulación de P por las plantas.

En base a los resultados de este estudio, el uso de humedales para mejorar los impactos de pulsos de entrada de agua enriquecida en P en la laguna del Mar Menor, y en otras zonas similares, es una opción adecuada, incluso bajo un escenario de entradas intermitentes de agua eutrofizada a lo largo del año.

Desde el punto de vista de la eliminación del P, la construcción de estos humedales debería de tener en cuenta la característica más favorable de los suelos de los humedales naturales de la zona: la incorporación como sustrato de materiales carbonatados de textura fina en cualquier fase del proceso de retención. Asimismo, se recomienda el uso de *Phragmites*, ya que esta especie puede contribuir a aumentar la capacidad del sustrato de retener P y, en menor medida, por la acumulación de P en los tejidos vegetales.

7.6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL2010–20214).

7.7. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, FJ., Egea, C. 2006. Phosphorus and nitrogen content in the water of a coastal wetland in the Mar Menor lagoon (SE Spain): relationships with effluents from urban and agricultural areas. *Water, Air and Soil Pollution*, 173: 21–38.

- Álvarez-Rogel, J., Ortiz, R., Vela, N., Alcaraz, F. 2001. The application of the FAO and US soil taxonomy systems to saline soils in relation to halophytic vegetation in SE Spain. *Catena*, 45: 73–84.
- Álvarez-Rogel, J., Tercero, M.C., Arce, M.I., Delgado, M.J., Conesa, H.M., González-Alcaraz, M.N. 2016. Nitrate removal and potential soil N₂O emissions in eutrophic salt marshes with and without *Phragmites australis*. *Geoderma*, 282: 49–58.
- Armstrong, W., Cousins, D., Armstrong, J., Turner, D.W., Beckett, P.M. 2000. Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas–exchange with the rhizosphere: a microelectrode study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany*, 86: 687–703.
- Azzouz, S., Meribout, R., Boukhalifa, C. 2012. Characterization of phosphate adsorption on sediments. *Procedia Engineering*, 33: 285–292.
- Boar, R.R. 1996. Temporal variations in the nitrogen content of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. from a shallow fertile lake. *Aquatic Botany*, 55: 171–181.
- Canga, E., Heckrath, G.J., Kjaergaard, C. 2016. Agricultural Drainage Filters. II. Phosphorus Retention and Release at Different Flow Rates. *Water, Air and Soil Pollution*, 227–276.
- Cooper, P. 2009. What can we learn from old wetlands? Lessons that have been learned and some that may have been forgotten over the past 20 years. *Desalination*, 246: 11–26.
- Di, H.J., Cameron, K.C. 2002. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: Sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 64: 237–256.

- Dupas, R., Gruau, G., Gu, S., Humbert, G., Jaffrezic, A., Gascuel-Oudou, C. 2015. Groundwater control of biogeochemical processes causing phosphorus release from riparian wetlands. *Water Research*, 84: 307–314.
- Fink, D.F., Mitsch, W.J. 2007. Hydrology and nutrient biogeochemistry in a created river diversion oxbow wetland. *Ecological Engineering*, 30: 93–102.
- Gao, Z., Bai, J., Jia, J., Wen, X., Zhang, G., Zhao, Q. 2015. Spatial and temporal changes of phosphorus in coastal wetland soils as affected by a tidal creek in the Yellow River Estuary, China. *Physics and Chemistry of the Earth*, 89–90: 114–120.
- García-Pintado, J., Martínez-Mena, M., Barberá, G., Albaladejo, J., Castillo, V.M. 2007. Anthropogenic nutrient sources and loads from a Mediterranean catchment into a coastal lagoon: Mar Menor, Spain. *Science of the Total Environment*, 373: 220–239.
- González-Alcaraz, M.N., Álvarez-Rogel, J., María-Cervantes, A., Egea, C., Conesa, H.M. 2012a. Evolution and phosphorus fractionation in saline Spolic Technosols flooded with eutrophic water. *Journal of Soils and Sediments*, 12: 1316–1326.
- González-Alcaraz, M.N., Egea, C., Jiménez-Cárceles, F.J., Párraga, I., María-Cervantes, A., Delgado, M.J., Álvarez-Rogel, J. 2012b. Storage of organic carbon, nitrogen and phosphorus in the soil–plant system of *Phragmites australis* stands from a eutrophicated Mediterranean salt marsh. *Geoderma*, 185–186: 61–72.
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M. 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, 321: 117–152.
- Huang, W., Chen, Q., Ren, K., Chen, K. 2015. Vertical distribution and retention mechanism of nitrogen and phosphorus in soils with different macrophytes of a

natural river mouth wetland. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 1–10.

Jiménez-Cárceles, F.J., Álvarez-Rogel, J. 2008. Phosphorus fractionation and distribution in salt marsh soils affected by mine wastes and eutrophicated water: a case study in SE Spain. *Geoderma*, 144: 299–309.

Jiménez-Martínez, J., García-Aróstegui, J.L., Hunink, J.E., Contreras, S., Baudron, P., Candela, L. 2016. The role of groundwater in highly human–modified hydrosystems: a review of impacts and mitigation options in the Campo de Cartagena–Mar Menor coastal plain (SE Spain). *Environmental Reviews*, DOI: [dx.doi.org/10.1139/er-2015-0089](https://doi.org/10.1139/er-2015-0089).

Karstens, S., Buczko, U., Glatzel, S. 2015. Phosphorus storage and mobilization in coastal *Phragmites* wetlands: Influence of local–scale hydrodynamics. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 164: 124–133.

Kim, D.G, Park, J., Lee, D., Kang, H. 2011. Removal of Nitrogen and Phosphorus from Effluent of a Secondary Wastewater Treatment Plant Using a Pond–Marsh Wetland System. *Water, Air and Soil Pollution*, 214: 37–47.

Lapointe, B.E, Herren, L.W., Debortoli, D.D., Vogel, M.A. 2015. Evidence of sewage–driven eutrophication and harmful algal blooms in Florida's Indian River Lagoon. *Harmful Algae*, 43: 82–102.

Legros, J.P. 2012. Major Soil Groups of the World: Ecology, Genesis, Properties and Classification. CRC Press. 478 pp.

Machado, A.I., Beretta, M., Fragoso, R., Duarte, E. 2016. Overview of the state of the art of constructed wetlands for decentralized wastewater management in Brazil. *Journal of Environmental Management*. DOI: [10.1016/j.jenvman.2016.11.015](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.015).

- Mitsch, W.J., Gosselink, J.G. 2007. *Wetlands*. Wiley, New York, EEUU. 234 pp.
- Moore, M.T., Kröger, R. 2011. Evaluating Plant Species-Specific Contributions to Nutrient Mitigation in Drainage Ditch Mesocosms. *Water, Air and Soil Pollution*, 217: 445–454.
- Moreno-González, R., Campillo, J.A., León, V.M. 2013. Influence of an intensive agricultural drainage basin on the seasonal distribution of organic pollutants in seawater from a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). *Marine Pollution Bulletin*, 77: 400–411.
- Moustafa, M.Z., White, J.R., Coghlan, C.C., Reddy, K.R. 2011. Influence of hydroperiod and vegetation type on phosphorus dynamics in flow-through wetland treatment systems. *Ecological Engineering*, 37: 1369–1378.
- Nairn, R.W., Mitsch, W.J. 2000. Phosphorus removal in created wetland ponds receiving river overflow. *Ecological Engineering*, 14: 107–126.
- Poach, M.E., Faulkner, S.P. 1998. Soil phosphorus characteristics of created and natural wetlands in the Atchafalaya delta, LA. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 46: 195–203.
- Reddy, K.R., DeLaune, R.D. 2008. *Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. 757 pp.
- Reddy, K.R., Diaz, O.A., Scinto, L.J., Agami, M. 1995. Phosphorus dynamics in selected wetlands and streams of the lake Okeechobee Basin. *Ecological Engineering*, 5: 183–207.
- Reddy, K.R., Kadlec, R.H., Flaig, E., Gale, P.M. 1999. Phosphorus retention in streams and wetlands: a review. *Environmental Science & Technology*, 29: 83–146.

- Robertson, G.P., Bruulsema, T.W., Gehl, R.J., Kanter, D., Mauzerall, D.L., Rotz, C.A., Williams, C.O. 2013. Nitrogen–climate interactions in US agriculture. *Biogeochemistry*, 114: 41–70.
- Sfriso, A., Marcomini, A., Pavoni, B. 1987. Relationships between macroalgal biomass and nutrient concentrations in a hypertrophic area of the Venice Lagoon. *Marine Environmental Research*, 22: 297-312.
- Shao, X., Liang, X., Wu, M., Gu, B., Li, W., Sheng, X., Wang, S. 2014. Influences of sediment properties and macrophytes on phosphorous speciation in the intertidal marsh. *Environmental Science and Pollution Research*, 21: 10432–10441.
- Silvan, N., Vasander, H., Laine, J. 2004. Vegetation is the main factor in nutrient retention in a constructed wetland buffer. *Plant and Soil*, 258: 179–187.
- Song, K.Y., Zoh, K.D., Kang, H. 2007. Release of phosphate in a wetland by changes in hydrological regime. *Science of the Total Environment*, 380: 13–18.
- SPSS Inc. 2006. Manual del usuario del SPSS Base 15.0. SPSS Inc, Chicago, EEUU.
- Tournebize, J., Chaumont, C., Mander, U. 2016. Implications for constructed wetlands to mitigate nitrate and pesticide pollution in agricultural drained watersheds. *Ecological Engineering*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.02.014>.
- Tylová, E., Steinbachová, L., Votrubová, O., Gloser, V. 2008. Phenology and autumnal accumulation of N reserves in belowground organs of wetland helophytes *Phragmites australis* and *Glyceria maxima* affected by nutrient surplus. *Environmental and Experimental Botany*, 63: 28–38.
- Vepraskas, M.J., Faulkner, S.P. 2001. Redox chemistry of hydric soils. En: Richardson, J.L., Vepraskas, M.J. (Eds.), *Wetland Soils. Genesis, hydrology, landscape and classification*. Lewis Publishers, Florida, pp. 85–106.

- Verhoeven, J.T.A., Arthur, F.M., Meuleman, A.F.M. 1999. Wetlands for wastewater treatment: Opportunities and limitations. *Ecological Engineering*, 12: 5-12.
- Vohla, C., Kõiv, M., Bavor, H.J., Chazarenc, F., Mander, Ü. 2011. Filter materials for phosphorus removal from wastewater in treatment wetlands – A review. *Ecological Engineering*, 37: 70-89.
- Vymazal, J. 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 380: 48-65.
- Wang, Q., Li, Y. 2010. Phosphorus adsorption and desorption behaviour on sediments of different origins. *Journal of Soils and Sediments*, 10: 1159–1173.
- Wang, Y., Shen, Z., Niu, J., Liu, R. 2009. Adsorption of phosphorus on sediments from the Three–Gorges Reservoir (China) and the relation with sediment compositions. *Journal of Hazardous Materials*, 162: 92–98.
- WWF Spain, 2016. El Mar Menor, cada vez más cerca del límite. <http://www.wwf.es/?39380/El-Mar-Menor-cada-vez-ms-cerca-del-limite> (accessed 29.09.2016).
- Xu, N., Yin, H., Chen, Z., Liu, S., Chen, M., Zhang, J. 2014. Mechanisms of phosphate retention by calcite: effects of magnesium and pH. *Journal of Soils and Sediments*, 14: 495–503.
- Yang, L., Chang, H.T., Lo Huang, M.N. 2001. Nutrient removal in graveland soil–based wetland microcosms with and without vegetation. *Ecological Engineering*, 18: 91–105.
- Zhang, D.Q., Jinadasa, K.B.S.N., Gersberg, R.M., Liu, Y., Ng, W.J., Tan, S.K. 2014. Application of constructed wetlands for wastewater treatment in developing

countries - A review of recent developments (2000-2013). *Journal of Environmental Management*, 141: 116-131.

Zhao, Y.J., Liu, B., Zhang, W.G., Ouyang, Y., Qing An, S. 2010. Performance of pilot-scale vertical-flow constructed wetlands in responding to variation in influent C/N ratios of simulated urban sewage. *Bioresource Technology*, 101: 1693-1700.

PARTE III

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 8

Conclusiones generales y consideraciones para el uso de humedales para prevenir la eutrofización de la laguna del Mar Menor

8. CONCLUSIONES GENERALES Y CONSIDERACIONES PARA EL USO DE HUMEDALES PARA PREVENIR LA EUTROFIZACIÓN DE LA LAGUNA DEL MAR MENOR

8.1. CONCLUSIONES GENERALES

Basándonos en los resultados obtenidos y en relación con los objetivos propuestos, las conclusiones generales de la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

1. En los horizontes superficiales del suelo, de textura fina, la alternancia de condiciones de inundación–secado fue el principal factor que determinó los cambios de potencial redox, independientemente del nivel de eutrofización del agua, la presencia de *Phragmites australis* y las variaciones estacionales de temperatura del suelo. Por lo tanto, el potencial microbiológico del suelo fue suficiente para inducir los procesos biogeoquímicos que proporcionan a los humedales la capacidad de actuar como filtros verdes.
2. En concordancia con lo anterior, la eliminación del N-NO_3^- en dichos horizontes superficiales fue igual de eficiente en todos los tratamientos ensayados, siendo la desnitrificación el principal proceso implicado, independientemente del nivel de eutrofización del agua, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año. Las tasas de emisión potencial de $\text{N-N}_2\text{O}$ del suelo medidas apoyaron que la desnitrificación fuera el principal mecanismo de retirada del N-NO_3^- del agua eutrofizada. Además, los valores extremadamente bajos de potencial redox alcanzados tras tres–cuatro semanas de saturación del suelo en agua apuntan a que la reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA) pudo contribuir a la eliminación del N-NO_3^- al final de las fases de inundación.
3. Independientemente de lo expresado en los puntos 1 y 2 en relación a la eficiencia en el proceso de desnitrificación, la actividad microbiana del suelo se vio estimulada con la subida de la temperatura, tal y como mostraron las mayores emisiones de CO_2 del suelo y la mayor aromaticidad y contenido en compuestos

fenólicos de la materia orgánica disuelta en el agua de poro a temperaturas del suelo entre ≈ 20 y ≈ 30 °C. Aunque el nivel de eutrofización del agua y la presencia de *Phragmites australis* no jugaron un papel crucial en dicha actividad, sí la favorecieron.

4. Aunque la adición de carbono orgánico disuelto en el agua de inundación estimuló la actividad microbiana del suelo, la dinámica de dicho carbono en el agua de poro sugiere que la principal fuente de carbono y energía utilizada por dichos microorganismos fue la materia orgánica nativa del suelo, independientemente de la presencia de *Phragmites australis*.
5. A diferencia de los horizontes superficiales del suelo, en los horizontes subsuperficiales, de textura arenosa, la presencia de plantas de *Phragmites australis* sí tuvo un papel relevante frenando la disminución del potencial redox, lo que pudo atribuirse a la capacidad de dicha especie para introducir oxígeno en el suelo a través del aerénquima. Dado que la capacidad de aireación está relacionada con la actividad fisiológica de las plantas, ésta se vio perjudicada cuando dicha actividad disminuyó debido a las altas temperaturas del verano (≈ 40 °C).
6. *Phragmites australis*, además de tener un papel relevante en la biogeoquímica de los horizontes subsuperficiales arenosos, también lo tuvo en la eliminación del N- NO_3^- en profundidad. Las plantas contribuyeron a una depuración más rápida del agua de poro de los horizontes subsuperficiales durante las fases de secado al absorber el N- NO_3^- formado por nitrificación a partir del N- NH_4^+ acumulado durante las fases de inundación.
7. Los horizontes superficiales del suelo fueron los principales sumideros de P en los humedales ensayados, quedando éste retenido, principalmente, en compuestos de Ca/Mg, independientemente del nivel de eutrofización del agua, la presencia de *Phragmites australis* y el periodo del año. Las plantas tuvieron un papel secundario,

favoreciendo la retención de P en los óxidos metálicos y acumulándolo en partes aéreas y subterráneas.

8.2. CONSIDERACIONES PARA EL USO DE HUMEDALES PARA PREVENIR LA EUTROFIZACIÓN DE LA LAGUNA DEL MAR MENOR

8.2.1. HUMEDALES Y USOS DEL TERRITORIO

Como ya se ha comentado en diversos capítulos de la presente Tesis Doctoral, el uso de humedales para depurar agua es una alternativa ampliamente utilizada, tanto para problemas de contaminación puntual como difusa. La construcción de humedales para tratar efluentes de aguas eutrofizadas y/o contaminadas generados en áreas con uso intensivo del territorio se ha puesto en práctica con éxito en numerosas ocasiones. El caso particular del Campo de Cartagena–Mar Menor es un claro ejemplo en el que se puede aplicar esta "tecnología verde", ya que representa una situación en la que existen vertidos puntuales con alta carga de nutrientes además de escurrimientos difusos provocados por las escorrentías superficiales. De hecho, como ya se ha explicado en el capítulo 2, en el año 2016 se comenzó a desarrollar un proyecto para la construcción de un gran filtro verde basado, fundamentalmente, en un sistema de lagunaje que centralice la depuración de los efluentes agrícolas en la parte baja de la cuenca, junto a la laguna del Mar Menor. Frente a esta opción, se han planteado también otras basadas en la construcción de humedales más pequeños aguas arriba de la línea de costa, en puntos estratégicos de la cuenca a los que viertan aguas provenientes de varias fincas o microcuencas. Esto permitiría tratar caudales más pequeños en diversos lugares, en vez de grandes volúmenes de agua en un único punto. Una vez depuradas, las aguas pasarían a los cauces principales hasta alcanzar la laguna.

La opción de construir una red de humedales no está exenta de dificultades. Habría que estudiar en detalle la red de drenaje con el fin de instalar los humedales en enclaves estratégicos y resolver diversos aspectos técnicos, tales como la recogida y conducción de las entradas de efluentes puntuales y difusos y su posterior salida una

vez atravesado el humedal. También habría que considerar los problemas de índole económico–social, como la propiedad de los terrenos en los que llevar a cabo la construcción de dichos humedales, y los asociados a la permanencia del agua en los sistemas (por ejemplo, la presencia de mosquitos), entre otros. Otro factor importante a tener en cuenta es el mantenimiento de los humedales, que incluye, entre otros factores, la poda y gestión de la biomasa vegetal y su revisión periódica para evitar que se "atasquen" por exceso de sedimentación y el agua no pueda circular produciendo desbordamientos, etc.

En todo caso, la construcción de estos pequeños humedales debería formar parte de una serie de actuaciones para armonizar de una forma más coherente el uso del territorio a nivel del conjunto de la cuenca. Se deberían incluir prácticas como una mejor gestión y manejo del suelo para reducir la erosión, incluyendo la restauración y estabilización de riberas en algunos cauces, una optimización del uso del agua y fertilizantes para reducir los lixiviados, un uso más comedido de las enmiendas orgánicas tipo estiércol, una mejor depuración de las aguas de origen urbano en épocas de máxima afluencia de visitantes, una mejora de la red de conducciones de las aguas residuales urbanas, etc. Obviamente, estas prácticas no pueden llevarse adelante sin una participación activa por parte de la Administración que incluya ayudas económicas a los agentes implicados.

Además de la construcción de pequeños humedales y del desarrollo de las medidas de manejo del territorio citadas, se podría favorecer la conducción de caudales de escorrentía superficial hacia zonas que ya ejercen un papel como filtros verdes naturales. Se trataría de pequeñas áreas marginales de los humedales naturales que ya existen en la zona, y que actualmente se encuentran más o menos degradadas o alteradas. Entre los posibles lugares candidatos, destacan aquellos enclaves en los que diversos cauces alcanzan la laguna como por ejemplo: un sector de la Playa de la Hita, un sector de la zona militar ubicada al Sur de Los Alcázares, el extremo Norte del saladar de la Marina del Carmolí (junto a la desembocadura de la Rambla del Albuñón), el pequeño humedal ubicado entre Los Urrutias y la Estrella de Mar, sectores del Saladar de Lo Poyo, sectores de la Lengua de la Vaca, y el humedal situado entre el

Camping Caravaning e Islas Menores. En cualquier caso, sería necesario un estudio más detallado de estas zonas como posibles candidatas naturales de tratamiento de aguas de escorrentía. Asimismo, se podrían desarrollar actuaciones en los propios cauces (por ejemplo, Ramblas de Miranda y del Miedo) para favorecer su papel de filtro natural de nutrientes (modificación de motas, manejo adecuado de la vegetación para aprovechar al máximo su capacidad de filtración y/o retención de nutrientes, etc.).

8.2.2. ASPECTOS ESPECÍFICOS A CONSIDERAR SOBRE LA CONSTRUCCIÓN DE HUMEDALES EN EL CAMPO DE CARTAGENA

Decir, en primer lugar, que los humedales que se han ensayado en la presente Tesis Doctoral, aunque han tenido un flujo subsuperficial, no corresponden a los estándares habituales de humedales artificiales. En la Tesis se ha trabajado con "suelo nativo" recogido de un humedal natural, en lugar de hacerlo con materiales de cantera o gravera de diferente granulometría, que son los que habitualmente se utilizan en la construcción de humedales. Uno de los fundamentos de trabajar con gravas es facilitar la circulación del agua, permitiendo una velocidad de flujo suficiente a través del sistema y reduciendo el riesgo de atasco/obturación al tratarse de una matriz altamente porosa. El suelo, por contra, puede generar problemas al no tener la conductividad hidráulica suficiente para mantener la velocidad de flujo que requiere el sistema, lo que reduciría el volumen de agua por unidad de tiempo (esto es, el caudal a tratar). En los experimentos realizados en la Tesis se ha mantenido un tiempo de residencia del agua de unas tres–cuatro semanas sin flujo continuo, lo cual está alejado de las condiciones para que un humedal construido tenga un buen rendimiento en cuanto al caudal de agua capaz de ser depurada. Sin embargo, frente a estos inconvenientes, se encuentra el elevado potencial microbiológico y la capacidad de adsorción y reactividad del suelo, que permite denominar a estos sistemas como "humedales reactivos", cuyo funcionamiento biogeoquímico es equiparable al que ocurre en condiciones naturales.

Como se ha demostrado en esta Tesis, la capacidad del ambiente edáfico para alcanzar las condiciones óptimas de potencial redox que induzcan la desnitrificación de

forma rápida es muy elevada y, aunque se aporte carbono orgánico con el agua a tratar, la materia orgánica del propio suelo es clave para mantener la actividad microbiana. Esto sería más difícil de conseguir en un sistema con grava, en el que no existiría una población microbiana nativa previa, por lo que los procesos dependientes de la actividad microbiológica estarían más supeditados a la comunidad de microorganismos que se desarrollara por los aportes de nutrientes del agua a tratar y por las mejoras inducidas por la rizosfera de la vegetación que se implantara.

En cuanto a la capacidad de adsorción y la reactividad del suelo, un sistema que cuente en su granulometría con partículas de limo fino y arcilla, así como con humus y complejos arcillo-húmicos, y con capacidad de tamponamiento será mucho más efectivo que un sistema formado únicamente por gravas. El complejo de cambio del suelo proporcionará poder de adsorción de cationes, así como de aniones unidos a cationes que hagan de puente como es el caso de los complejos $\text{Ca}^{2+}-\text{PO}_4^{3-}$. La capacidad de tamponamiento, proporcionada por los cationes del complejo de cambio del suelo y otros componentes como la caliza activa, podrá neutralizar los cambios de pH y reducir la movilidad de elementos metálicos que pudieran solubilizarse debido a las bajadas de potencial redox. En base a las propiedades citadas, un sistema que incluyera el suelo entre sus componentes no sólo sería capaz de eliminar nitrato (NO_3^-) sino que también sería efectivo para retener y/o inactivar otros elementos o compuestos potencialmente indeseables, tales como herbicidas, plaguicidas y farmacéuticos. Dado que se ha demostrado que las aguas que van a parar a la laguna del Mar Menor contienen además de NO_3^- otras sustancias, el uso de humedales reactivos sería de gran utilidad. Debido a que muchos de los productos agroquímicos son fotodegradables, sería interesante propiciar este proceso permitiendo, por ejemplo, que el agua a tratar quedara expuesta a la luz solar en alguna etapa durante su circulación por los humedales.

Como se ha discutido en los capítulos de resultados de la Tesis, el papel de *Phragmites australis* ha sido relevante en algunos aspectos del funcionamiento de los humedales ensayados, tales como la regulación de los procesos biogeoquímicos, pero no tanto en la capacidad de depuración de N y P del agua. Como ya se ha citado al

discutir los resultados, la relevancia de las plantas en la depuración de aguas eutrofizadas es un tema ampliamente debatido en la literatura científica. No obstante, la presencia de plantas es fundamental ya que además de modular el comportamiento biogeoquímico a lo largo del año a través de su actividad fisiológica, de proporcionar un ambiente más adecuado para los microorganismos en su rizosfera y de aportar materia orgánica al medio, la vegetación actúa regulando la circulación del agua tanto a nivel de flujo superficial como subsuperficial. Además, la presencia de *Phragmites australis* ayuda a crear un ambiente lo más parecido posible al de los humedales naturales propios de la zona.

En base a las consideraciones de los párrafos anteriores, y a estudios de campo realizados en el Campo de Cartagena, se pueden resumir y enumerar diversos aspectos a tener en cuenta para el uso de humedales reactivos similares a los ensayados en la presente Tesis Doctoral para reducir la eutrofización, y por extensión la contaminación, de la laguna del Mar Menor:

1. Los caudales de agua que se pretende depurar. Se tendrán en cuenta para crear una matriz que permita una adecuada conductividad hidráulica. Si fuera necesario, se podría mezclar el suelo con grava para permitir un flujo adecuado sin perder la reactividad aportada por el suelo.
2. La superficie disponible para la instalación del humedal, la topografía de la zona y la ubicación en relación a las entradas y salidas de agua. Esto determinará el diseño espacial del humedal, así como de las infraestructuras asociadas a las conducciones de entrada, circulación y salida de agua del sistema.
3. La utilización de suelo de la zona para la construcción de los humedales. Esta alternativa supone una ventaja desde el punto de vista de la capacidad de eliminación de NO_3^- y fosfato (PO_4^{3-}) de las aguas, y probablemente también de otros compuestos. No obstante, la textura fina de dichos suelos puede hacer necesaria su mezcla con gravas a fin de mejorar la capacidad para conducir el flujo de agua. Además, hay que tener presente la posible dificultad para disponer de la

cantidad necesaria de suelo, en caso de que no sea posible utilizar el propio del lugar en el que se vaya a construir el humedal.

4. El uso de materiales alternativos al suelo. En caso de que no se disponga de suelo de la zona, o éste se deba mezclar con otro sustrato, el material alternativo debería ser carbonatado, lo que ayudaría a favorecer la retención de P.
5. El uso de humedales multi-etapa. Aunque los experimentos realizados han consistido en una única etapa de depuración basada en la reactividad y potencial microbiológico del sistema suelo-planta, sería interesante introducir alguna etapa consistente en una lámina de agua libre para propiciar la fotodegradación de posibles agroquímicos.
6. El uso de un régimen alternante de inundación-secado. En este trabajo no se ha comparado la alternancia de inundación-secado con inundación permanente, por lo que no se puede afirmar con certeza si el rendimiento de los humedales sería distinto en ambos regímenes. No obstante, los trabajos de campo realizados en la zona, así como la literatura científica consultada, indican que un sistema con ciclos de inundación-secado tiene un mejor rendimiento y una vida útil más larga. Por tanto, sería recomendable, al menos, ensayar ambas opciones y, en caso de que esto no fuese posible, planificar humedales en los que se pudieran alternar ambas condiciones.
7. La utilización de *Phragmites australis*. Dado que es importante que los humedales cuenten con vegetación, esta especie, muy habitual en la zona y con gran facilidad para su implantación y desarrollo, se considera una buena alternativa.
8. El mantenimiento y poda de *Phragmites australis*. Si se desarrollan humedales con ciclos de inundación-secado con dicha especie, las podas deberían hacerse al principio de las fases de secado, pero tras un lapso de tiempo que permita la absorción del NO_3^- formado a partir del amonio (NH_4^+) acumulado durante la fase de

inundación, disminuyendo así la disponibilidad de NO_3^- como sustrato para la desnitrificación.

